

Série A, N° 3.037

N° d'ordre : 3.909

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jacqueline JOLLES-THAUREAUX

1^{re} THÈSE :

STRUCTURE PARTIELLE DU LYSOZYME DE BLANC
D'ŒUF DE POULE

2^e THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 6 Juin 1957 devant la Commission d'examen

MM. FROMAGEOT,	Président
CHAMPETIER	} Examineurs
LEDERER	

PARIS
IMPRIMERIE R. FOULON
29, RUE DEPARCIEUX, 29
1957

Série A, N° 3.037

N° d'ordre : 3.909

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Jacqueline JOLLES-THAUREAUX

1^{re} THÈSE :

STRUCTURE PARTIELLE DU LYSOZYME DE BLANC
D'ŒUF DE POULE

2^e THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 6 Juin 1957 devant la Commission d'examen

MM. FROMAGEOT, Président
CHAMPETIER
LEDERER } Examineurs



PARIS

IMPRIMERIE R. FOULON

29, RUE DEPARCIEUX, 29

1957

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LUCAS	T	Recherches physiques.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.	ARNULF	T	Optique appliquée.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.	M. MORAND	T	Physique.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	SOLEILLET	T	Physique.
JOB	T	Chimie générale	FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées	DANJON	T	Astronomie.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.	FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
LAUGIER	T	Physiologie générale.	JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).	PETIT	T	Biologie maritime.
BARRABE	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.	QUENEY	T	Météorologie et Dynamique atmosphérique.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	GALLIEN	T	Embryologie.
J. BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
PLANTEFOL	T	Botanique.	DE CUGNAC	T	Biologie végétale (P.C.B.).
GRASSE	T	Evolution des êtres organisés.	Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
PRÉVOST	T	Chimie organique.	THELLIER	T	Physique du Globe.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	AUDUBERT	T	Electrochimie
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	L'HÉRITIER	T	Génétique.
WYART	T	Minéralogie.	GRIVET	T	Radioélectricité.
TEISSIER	T	Zoologie.	PONCIN	T	Mécanique des fluides.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	THIRY	T	Mécanique appliquée.
P. AUGER	T	Physique quantique et Relativité.	DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	QUELET	T	Chimie organique.
PIVETEAU	T	Géologie.	CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
ROCARD	T	Physique (E.N.S.).	CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.).	CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
LAFFITTE	T	Chimie générale.	JUNG	T	Pétrographie.
FAVARD	T	Mécanique générale.	TRILLAT	T	Microscopie et Diffraction électronique.
COULOMB	T	Physique du Globe.	WIEMANN	T	Chimie organique structurale.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).	JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	VASSY		Physique de l'atmosphère.
P. DRACH	T	Zoologie.	DESTOUCHES		Théories physiques.
KASTLER	T	Physique.	M. PRUVOST	T	Géologie.
EPHRUSSI	T	Génétique.	AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	HOCART	T	Minéralogie.
RIVIÈRE	T	Géologie (S.P.C.N.).	J.-P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).	COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.).
			MAY	T	Biologie animale (P.C.B.).

CHOQUET	T	Calcul différentiel et intégral.	GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.).
FELDMANN		Biologie (P.C.B.).	PISOT	T	Calcul des probabilités.
GUINIER	T	Physique (P.C.B.).	E. ROCH		Géologie.
JOST	T	Biologie (P.C.B.).	SCHATZMANN ..		Astrophysique.
FORTET	T	Calcul des probabilités.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
SCHWARTZ	T	Méthode mathématique de la Physique.	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
CHOLIARD	T	Physiologie végétale.	JOLIOT	T	Physique nucléaire et Radioactivité.
MALAVARD	T	Aviation.	LENNUIER		Physique (P.C.B.).
BRELOT	T	Calcul différentiel.	RIZET		Génétique.
NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).	Mme TONNELAT ..		Théories physiques.
BÉNARD	T	Chimie (P.C.B.).	DIXMIER		Mathématiques (M.P.C.).
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.).	SOUCHAY		Chimie (P.C.B.).
DUGUÉ	T	Statistiques mathématiques.	AIGRAIN		Physique (P.C.B.).
GÉLOSO		Chimie (S.P.C.N.).	BRUSSET		Chimie (P.C.B.).
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.	M. LÉVY		Physique théorique.
ULRICH	T	Physiologie végétale.	LENORMANT		Physiologie.
MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.	Mme CHAIX		Chimie biologique.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.	Mme HUREL-PY ..		Biologie végétale (P.C.B.).
CHADEFAUD		Botanique.	PIAUX		Chimie (P.C.B.).
DESTRIAU		Physique (M.P.C.).	BRUN		Mécanique expérimentale des fluides.
Mlle LE BRETON ..		Physiologie générale.	LEDERER		Chimie biologique.
SALEM		Mathématiques générales.	Mme DUBREIL ..		Mathématiques.
LELONG	T	Mathématiques générales.	Mme LELONG ..		Mathématiques (E.N.S.).
DEVILLERS		Anatomie et Histologie comparées.	BELLAI		Géologie (S.P.C.N.).
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.	COTTE	T	Physique (M.P.C.).
FRANÇON		Physique (M.P.C.).	J.-E. DUBOIS ..		Chimie (M.P.C.).
GLANGEAUD	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	LAMOTTE		Zoologie.
			LE ROLLAND ...		Mécanique des fluides.
			MICHEL		Chimie (P.C.B.).

Secrétaire général C. MONIER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

L'établissement de la structure d'une protéine ne paraît possible que depuis deux ans à peine. Les méthodes connues jusqu'à cette date avaient simplement permis de déterminer l'enchaînement des acides aminés dans plusieurs polypeptides, dont très peu avaient un poids moléculaire supérieur à 2 000. Parmi ces derniers, citons les deux chaînes A et B de l'insuline de bœuf [1, 2, 3, 4, 5] et la β -corticotropine [6, 7]. Le plus souvent l'hydrolyse acide partielle était choisie comme moyen de scission ; cette technique ne rendait plus les mêmes services dès que l'on était en présence de molécules plus grandes. En effet, la complexité du mélange de peptides résultant de l'hydrolyse acide partielle d'une protéine de poids moléculaire 15 000 par exemple rendrait très difficile leur séparation et leur purification ; il serait pratiquement impossible devant le grand nombre de peptides courts obtenus de remonter à une séquence unique contenue dans la molécule-mère. Comme l'a noté SANGER dès 1952 [8], il était indispensable dans ce genre de recherches d'avoir à sa disposition des techniques permettant d'une part de scinder spécifiquement les protéines en de grands morceaux, et d'autre part de séparer et de purifier ces polypeptides.

Ce sont les enzymes protéolytiques qui ont permis, grâce à leur spécificité, de résoudre le problème que l'on vient de soulever. Leur utilisation s'est de plus en plus répandue et c'est ainsi que, par exemple, SANGER a élucidé les structures de plusieurs insulines [9, 10], BELL [6] ainsi que WHITE et LANDMANN [7] celle de la β -corticotropine et BEHRENS [11] celle du glucagon. De tous les enzymes protéolytiques dont on peut actuellement disposer, la trypsine possède la spécificité la plus grande. Les travaux de BERGMANN et FRUTON [12] sur des substrats synthétiques ont montré que cet enzyme hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de l'arginine et de la lysine. L'hydro-

lyse trypsique de plusieurs protéines a été étudiée et, dans chaque cas, on a pu observer la même spécificité. L'action de la trypsine sur l'insuline [2, 4], la corticotropine [6, 7], le cytochrome c [13], la protamine [14], le chymotrypsinogène [15, 16], le trypsino-gène [17], la ribonucléase [18] et le glucagon [11] a donné naissance à des peptides dans lesquels soit un résidu de lysine, soit un résidu d'arginine occupe la position C-terminale. Parmi les autres enzymes protéolytiques aujourd'hui couramment employés, citons la papaïne, la subtilisine, la pepsine et la chymotrypsine. Parmi ces derniers, c'est surtout la chymotrypsine qui semble douée d'une certaine spécificité ; mais elle est loin d'égaler celle de la trypsine. L'hydrolyse semble se porter surtout sur les liaisons peptidiques comprenant le groupement carboxylique de résidus du type $\text{—NHCH(CH}_2\text{R)CO—}$ où R est un reste aromatique ou un reste neutre, assez long, pouvant par exemple appartenir à la leucine [19].

La séparation et la purification des peptides ont pu être résolues grâce à la chromatographie de l'hydrolysats enzymatique sur colonne de résine échangeur d'ions Dowex 50X2 et aussi grâce à l'ionophorèse sur papier.

Le présent travail décrit les méthodes et les différentes étapes à suivre en vue d'établir la structure chimique d'une protéine : nous les appliquerons à la détermination de la structure partielle du lysozyme de blanc d'œuf de poule. Jusqu'à présent, parmi les protéines de poids moléculaire égal ou supérieur à 15 000, on connaît une seule structure d'ailleurs encore de façon incomplète : celle de la ribonucléase [18, 20, 21, 22]. L'étude du lysozyme renferme une difficulté que l'on ne rencontrait pas dans le cas de la ribonucléase : il s'agit de la présence de résidus de tryptophane détruits aussi bien par hydrolyse acide que par oxydation performique lors de l'étude de la composition des peptides.

Dans une première partie, nous décrirons l'action de la trypsine sur le lysozyme dénaturé par la chaleur ou oxydé par l'acide performique. Comme cette protéine contient 11 résidus d'arginine et 6 résidus de lysine par molécule [23, 24, 25], l'hydrolyse trypsique devrait donner naissance à 17 ou 18 peptides (ou éventuellement acides aminés), de taille convenable pour être soumis à des études de structure. C'est ainsi que nous étudierons le comportement chromatographique de ces peptides sur des colonnes de Dowex 50X2, leur pureté, vérifiée par ionophorèse sur papier à des pH différents, et leur composition en acides aminés déterminés

quantitativement par chromatographie sur des colonnes de Dowex 50X4, ce qui nous a permis de calculer le rendement de chacun d'eux.

Dans une deuxième partie, nous montrerons comment nous avons établi la structure complète de plusieurs de ces peptides, et la structure partielle des autres. A la lumière de ces résultats, nous consacrerons quelques lignes à des observations sur la spécificité de la trypsine dans le cas présent.

Enfin dans une troisième partie, nous exposerons la dernière étape à franchir pour établir la structure partielle du lysozyme : la détermination de l'ordre dans lequel les peptides formés par action de la trypsine sont liés les uns aux autres au sein de la molécule primitive. L'étude des peptides contenant des acides aminés basiques et obtenus par action de la pepsine qui hydrolyse d'autres liaisons peptidiques que la trypsine, a permis de résoudre partiellement ce problème.

En conclusion, nous donnerons un schéma résumant nos connaissances actuelles sur la structure du lysozyme de blanc d'œuf de poule.

PREMIÈRE PARTIE

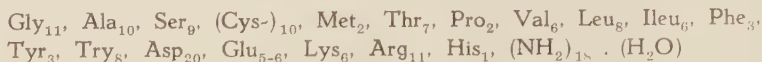
ACTION DE LA TRYPSINE SUR LE LYSOZYME

Le Lysozyme de blanc d'œuf de poule

De nombreux auteurs [26] ont constaté dans divers organes ou tissus d'animaux supérieurs, d'invertébrés et de végétaux, l'existence de substances qu'ils ont appelées « lysozymes ». la présence de ces lysozymes étant détectée par l'action lysante d'extraits de ces tissus sur *Micrococcus lysodeikticus*, et le qualificatif de lysozyme étant apparemment au moins justifié par le fait que l'on est en présence « d'agents » (ferments) lysants. La première et la mieux étudiée de ces protéines est le lysozyme de blanc d'œuf de poule, découvert par FLEMING [27]. Cet enzyme a fait l'objet de nombreux travaux. La facilité relative avec laquelle on l'obtient à l'état homogène, à l'état cristallisé [28] et en quantités convenables, la simplicité relative de la molécule et la facilité relative avec laquelle on peut déterminer quantitativement son activité biologique [29] en font un matériel de choix. On sait que cette activité s'exerce spécifiquement sur un polysaccharide, non encore isolé à l'état pur, présent dans la membrane cellulaire de bactéries appartenant à un groupe restreint dont *Micrococcus lysodeikticus* est le représentant classique, et que cette activité est essentiellement celle d'un agent de dépolymérisation et d'hydrolyse [30]. D'autre part, ce lysozyme présente une stabilité assez remarquable en milieu acide alors qu'il est très labile en milieu alcalin.

Son homogénéité a été vérifiée par TALLAN et STEIN par chromatographie sur colonne de résine échangeur d'ions Amberlite XE-64 (lot 67A) [31]. La transformation lente du carbonate de lysozyme d'œuf fraîchement préparé en un produit séparable par chromatographie sur Amberlite, quelque importante qu'elle puisse être, ne paraît pas affecter l'ordre d'enchaînement des acides aminés dans la molécule [31]. Il n'existe peut-être entre les deux composés qu'une différence due au nombre de groupements amidés.

D'après des données analytiques obtenues dans divers laboratoires [23, 24, 25, 32, 33], la formule brute actuellement admise du lysozyme d'œuf, comportant 128 résidus d'acides aminés, est la suivante :



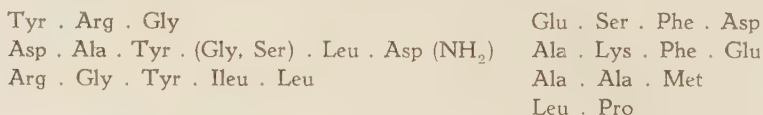
correspondant à un poids moléculaire de 14 600 environ.

La protéine est constituée par une chaîne peptidique unique, plus ou moins repliée sur elle-même, les replis étant maintenus par les cinq ponts ...S-S... des cinq résidus cystine. La rupture de ces ponts et leur remplacement par le nombre équivalent de groupes ...—S—CH₂—CO.NH₂ ne scinde nullement la molécule en plusieurs chaînes peptidiques [34].

L'étude de la structure du lysozyme d'œuf a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux. Les recherches de SCHROEDER [35] ont montré que l'enchaînement N-terminal est Lys . Val . Phe . Gly ; HARRIS [36] d'une part et THOMPSON [37] d'autre part ont trouvé par l'emploi de la carboxypeptidase que l'acide aminé C-terminal est la leucine.

A partir d'un hydrolysats partiel acide de la protéine, ACHER et coll. [38] ont isolé le tripeptide Arg . His . Lys, tandis que CROCKER [39] a établi la structure de plusieurs dipeptides contenant la tyrosine ainsi que l'enchaînement Asp . Tyr . Arg.

LAURILA [40] s'est attachée à l'étude des peptides courts contenant un acide aminé aromatique, obtenus soit par hydrolyse partielle acide, soit par hydrolyse chymotrypsique ou pepsique, après élimination des longs peptides par précipitation alcoolique. Les enchaînements trouvés sont les suivants :



Tous ces travaux ont utilisé la chromatographie sur papier comme moyen de purification.

THOMPSON [41] emploie la chromatographie sur colonne de résine Dowex 50X4 pour séparer un grand nombre de peptides (di-, tri- et tétrapeptides) provenant d'un hydrolysats acide partiel. En associant des morceaux qui paraissent provenir du même point de la molécule, cet auteur a proposé un certain nombre de séquences dont nous discuterons la validité à la fin de ce travail.

Les méthodes utilisées par les auteurs cités ci-dessus apportent de précieux renseignements sur certains fragments de la molécule de lysozyme, mais sont insuffisantes pour permettre de pousser plus loin l'étude de la structure de cette protéine.

Nous verrons au cours de ce travail comment l'emploi de la trypsine comme agent d'hydrolyse a permis de couper la molécule de lysozyme en un nombre limité de longs enchainements tous isolables à l'état pur et donc tous utilisables pour établir la structure de la molécule entière.

Action de la trypsine sur le lysozyme dénaturé et oxydé

ALDERTON, WARD et FEVOLD [42] ont constaté que le lysozyme natif n'est pas attaqué par la trypsine. Nous avons vérifié en chromatographiant sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A (en volume) : n-butanol-acide formique-eau (75-15-10) un hydrolysats trypsique de lysozyme natif, obtenu dans les conditions qui seront décrites ci-dessous, que la protéine n'a été que très légèrement attaquée. Une observation analogue a été faite avec la ribonucléase [43].

Avant d'être soumis à une hydrolyse trypsique, le lysozyme doit donc subir une transformation. Deux méthodes peuvent être utilisées : soit la dénaturation par la chaleur, soit l'oxydation performique.

a) DENATURATION PAR LA CHALEUR

ALDERTON et coll. [42] ont montré qu'un chauffage préalable du lysozyme le rendait sensible à l'action de la trypsine. Nous avons étudié les conditions de dénaturation et avons adopté la technique suivante : 500 mg de carbonate de lysozyme de blanc d'œuf de poule (lot 381-187) fourni par les laboratoires ARMOUR de Chicago sont chauffés, pendant 1 heure à 100° en solution aqueuse (pH 5,4) à 5 %. Dans ces conditions expérimentales, nous avons constaté que la protéine a perdu toute son activité lysante. Nous avons vérifié par un dosage de l'azote aminé selon VAN SLYKE-NEILL [44] que ce traitement n'avait rompu aucune liaison peptidique.

L'avantage de cette technique est de conserver intacts les résidus de tryptophane et de permettre l'étude des peptides qui comportent un de ces résidus. Par contre, tout peptide contenant un résidu de cystine serait difficile à étudier : un tel peptide se chromatographie mal sur papier et reste adsorbé sur une colonne de résine Dowex 50X2.

b) DENATURATION PAR OXYDATION PERFORMIQUE

L'oxydation performique qui transforme chaque résidu de cystine en deux résidus d'acide cystéique rend les peptides contenant ce nouvel acide aminé aptes à être chromatographiés. Par contre, les résidus de tryptophane sont transformés en leurs dérivés d'oxydation qui restent fortement fixés sur la colonne de résine.

Le lysozyme oxydé est préparé selon la méthode de MUELLER, PIERCE, DAVOLL et DU VIGNEAUD [45] : 500 mg de protéine sont dissous dans 45 ml du mélange oxydant composé d'une partie d'eau oxygénée à 30 volumes et de 9 parties d'acide formique concentré, mélange préparé une heure avant emploi. La solution est agitée pendant 45 minutes à -15° dans un mélange de glace et de sel. Au bout de ce temps, on ajoute 220 ml d'eau distillée, on congèle et on lyophilise. Le produit sec est repris deux fois par 20 ml d'eau et lyophilisé à nouveau.

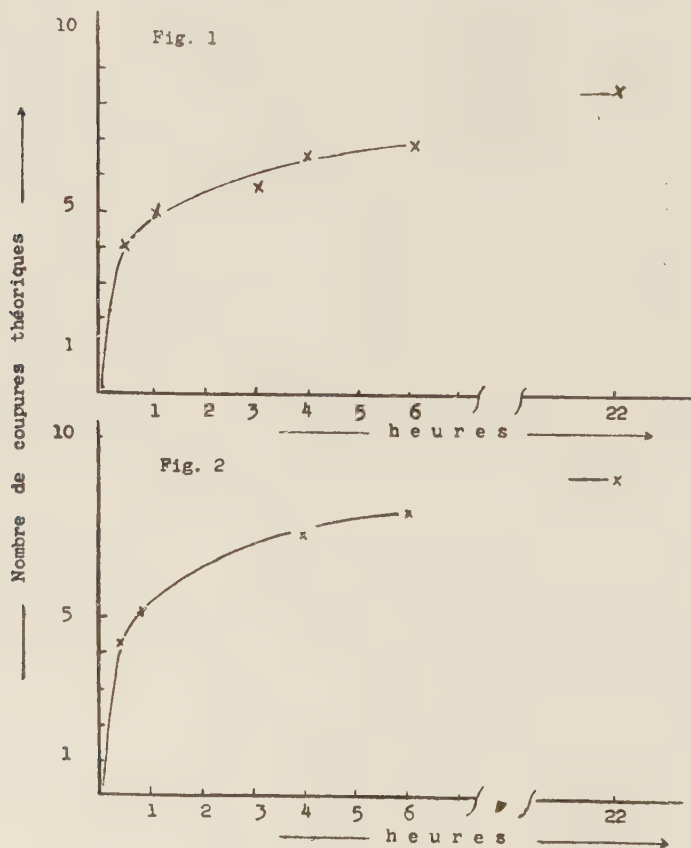
Nous avons vérifié après hydrolyse acide totale (110° ; 24 heures ; HCl 6 N) du lysozyme oxydé que la tyrosine n'a pas été détruite. La stabilité de cette protéine pendant l'oxydation performique peut être comparée à celle de la ribonucléase [43].

HYDROLYSE TRYPSIQUE

La trypsine utilisée est un échantillon deux fois recristallisé obtenu de la maison WORTHINGTON (lot TR 324), Freehold, N.J., et contenant 50 % de sulfate de magnésium.

L'hydrolyse trypsique est faite à 37° et à pH 7,8. Le lysozyme est dissous dans l'eau distillée et la concentration en substrat est fixée à 1 %. Le pH est ajusté à 7,8 par addition d'une solution de bicarbonate à 5 %. A ce stade, la trypsine est ajoutée et le rapport enzyme/substrat est de 1/100. On agite, grâce à un dispositif d'agitation magnétique, et la température est maintenue à 37° pendant 24 heures. La solution, trouble au début, s'éclaircit en 30 minutes dans le cas du lysozyme dénaturé et en 1 heure dans le cas du lysozyme oxydé.

Une incubation de lysozyme faite pendant 24 heures à 37° et dans les conditions décrites ci-dessus mais sans addition de trypsine, n'a donné lieu à aucune coupure, montrant qu'il s'agit bien ici d'une hydrolyse due à la trypsine et qu'il n'y a pas de contamination bactérienne.



FIGURES 1 et 2. — Nombre de coupures théoriques obtenues par action de la trypsine (37° ; pH 7,8 ; concentration en protéine 1 % ; rapport enzyme/substrat : 1/100) sur le lysozyme dénaturé (fig. 1) et oxydé (fig. 2)

Pour suivre le cours de l'hydrolyse trypsique, des fractions aliquotes sont prélevées au bout de 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 22 heures, amenées à pH 4 par addition d'acide acétique en vue d'arrêter l'ac-

tion enzymatique et analysées par le réactif à la ninhydrine [46], dosage sur lequel nous reviendrons plus loin. Les *figures 1* et *2* nous montrent le résultat de cette étude. Les temps au bout desquels les prélèvements sont faits sont portés en abscisse et le nombre de coupures théoriques en ordonnée. Les courbes nous montrent que la réaction est déjà presque complète dès les premières heures. Dans le cas du lysozyme dénaturé (*fig. 1*), nous avons obtenu 6-7 coupures théoriques totales, et dans le cas du lysozyme oxydé (*fig. 2*), ce nombre est de 8-9. Il y a intérêt à étudier un hydrolysats dans lequel le nombre de coupures obtenues est maximum pour un temps minimum d'hydrolyse ; le raccourcissement de ce dernier devrait en effet diminuer d'éventuelles réactions secondaires. Pour cette raison, nous avons étudié généralement les peptides provenant d'hydrolysats tryptiques de 6 heures (T et T_0). Toutefois dans un cas (T_0A), nous avons prolongé l'hydrolyse jusqu'à 24 heures et constaté l'identité des produits obtenus avec ceux provenant d'un hydrolysats de 6 heures. Seuls les rendements de quelques peptides diffèrent.

Séparation des peptides de l'hydrolysat trypsique

Généralement, la séparation des peptides d'un hydrolysat met en jeu des méthodes qui utilisent soit des différences de solubilité (chromatographie sur papier et méthode à contre-courant de Craig), soit des différences de charges (ionophorèse ou chromatographie sur colonne de résine échangeur d'ions).

Dans un travail préliminaire, nous avons utilisé une méthode employant successivement la chromatographie préparative sur papier dans plusieurs solvants puis l'ionophorèse sur papier. Elle ne fournit qu'un nombre restreint de courts peptides qui sont obtenus en petite quantité.

Par contre, l'emploi des résines échangeur de cations (Dowex 50) nous a permis de préparer quantitativement les peptides de l'hydrolysat trypsique et ceci quelle que soit leur longueur.

a) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

La chromatographie sur papier d'un hydrolysat trypsique complet n'est pas possible : en effet, les longs peptides qu'il peut contenir, en s'accumulant sur la ligne de départ, risquent d'empêcher une bonne séparation des peptides plus mobiles. Pour les éliminer, nous avons utilisé une précipitation par l'alcool, solvant facile à éliminer, de préférence à l'acide trichloracétique classique : l'hydrolysate trypsique est partiellement concentré à 40° sous vide de façon à amener la concentration en protéine à 2 % ; le lysozyme non hydrolysé et les longs peptides sont alors précipités par addition de trois volumes d'alcool éthylique à 95°. Après un repos de quelques heures dans la glacière, le précipité est éliminé par cen-

trifugation, puis lavé par l'alcool à 70°. L'ensemble des solutions alcooliques est évaporé à sec sous vide à 40°.

Le mélange des peptides courts ainsi obtenus est réparti sur la ligne de départ, des points témoins étant disposés de part et d'autre de la feuille. Deux solvants ont été utilisés :

— Solvant A : n-butanol-acide formique-eau (75-15-10 en volumes).

— Solvant B : n-butanol-phénol-acide acétique-eau (75-75-50-100 en volumes).

La première chromatographie est effectuée dans le solvant A sur papier Whatman n° 3 pendant 16 heures. Après révélation des témoins par le réactif à la ninhydrine (100 mg de ninhydrine, 96 ml n-butanol, 4 ml acide acétique), des bandes sont découpées à certains R_f , et l'éluat par l'eau distillée est concentré sous vide. Une nouvelle chromatographie est faite dans le solvant B sur papier Whatman n° 1 pendant 24 heures. Nous avons constaté que l'introduction du phénol dans le mélange classique butanol/acide acétique augmente le cheminement des peptides basiques et favorise la séparation de ceux qui ont un R_f voisin.

b) IONOPHORESE SUR PAPIER

La séparation des peptides est effectuée sur papier Whatman n° 1 selon la méthode de KUNKEL et TISELIUS [47]. La feuille de papier tamponnée est serrée fortement entre deux plaques de verre qui empêchent l'évaporation. Nous avons utilisé les solvants proposés par RYLE et coll. [5] :

— Solvant C (pH 6,5) : pyridine-eau-acide acétique (100-900-4 en volumes).

— Solvant D (pH 3,6) : pyridine-eau-acide acétique (10-890-100 en volumes).

Les techniques (répartition du matériel à séparer, révélation des points témoins, élution des peptides) sont analogues à celles utilisées dans la chromatographie préparative sur papier.

Ces deux méthodes présentent deux inconvénients majeurs : d'une part elles obligent à éliminer préalablement un très grand nombre de peptides de l'hydrolysat tryptique ; d'autre part, la multiplication des opérations de purification ne fournit que de très petites quantités de peptides purs et l'étude des structures n'est possible que dans le cas des peptides formés avec un fort rendement.

Nous avons pu néanmoins isoler quatre courts peptides (T_{p1} à T_{p4}) [48]. Le *tableau I* donne leurs R_f dans les solvants A et B et leur mobilité par rapport à celle de l'arginine au cours d'une ionophorèse à pH 6,5 (solvant C).

TABLEAU I

Peptides	Première chromatographie (A) (R_f)	Deuxième chromatographie (B) (R_f)	Ionophorèse (C) (m) *
T_{p1}	0,03	0,28	+ 0,7
T_{p2}	0,05	0,37	+ 0,6
T_{p3}	0,35	0,56	+ 0,7
T_{p4}	0,35	0,65	+ 0,5

* m : mobilité du peptide calculée par rapport à celle de l'arginine ($m = + 1$).

c) DISTRIBUTION A CONTRE-COURANT

Nous avons tenté d'améliorer le fractionnement des produits obtenus par hydrolyse trypsique en utilisant la méthode de CRAIG [49], méthode de distribution à contre-courant. Nous avons employé comme système de solvant les mélanges (en volumes) : n-butanol-acide acétique-eau (50-5-50 ; 40-10-50). Le fractionnement a pu être suivi soit par un dosage à la ninhydrine, soit par chromatographie sur papier dans le solvant A des différentes fractions. Un fractionnement comportant 90 transferts a permis de constater que les longs peptides se retrouvent dans les premières fractions et que les peptides T_{p1} à T_{p4} peuvent être purifiés dans une large mesure par ce procédé.

d) CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE RESINE ECHANGEUR D'IONS

La seule méthode qui s'est avérée fructueuse et qui a permis la séparation des différents constituants de l'hydrolysat trypsique, et ceci quelle que soit leur longueur, a été la chromatographie sur des colonnes de résine échangeur d'ions telle qu'elle a été publiée par HIRS, MOORE et STEIN [18]. Cette méthode nous a servi pour obtenir la plus grande partie de nos résultats : aussi allons-nous l'exposer avec quelques détails.

Dowex 50 est le nom de famille d'une série de résines échangeurs de cations fortement acides. Ce sont des copolymères de styrène et de divinylbenzène, qui sont ensuite sulfonés. Au cours de la préparation de ces résines, deux quantités peuvent varier et toutes les deux ont une influence sur leurs propriétés d'échangeur d'ions. Il s'agit d'une part de la quantité de divinylbenzène utilisée pour la polymérisation : c'est ce que l'on appelle le « crosslinkage » de la résine, ou polymérisation à trois dimensions, la polymérisation du styrène seul donnant naissance uniquement à un polymère linéaire ou bidimensionnel. Une résine ayant un fort crosslinkage (16 % de divinylbenzène) ou Dowex 50X16 est imperméable à des substances de poids moléculaire élevé, alors que la chromatographie de ces substances devient possible sur des résines à faible crosslinkage (4 ou 2 %) Dowex 50X4 ou X2. Expérimentalement, on a pu observer que la chromatographie des acides aminés est possible en travaillant avec des colonnes de Dowex 50X8 ou X4, celle des courts peptides avec des colonnes de Dowex 50X4. Mais les longs peptides trainent beaucoup sur cette dernière résine et ne donnent des pics étroits que sur des colonnes de Dowex 50X2. D'autre part, la deuxième quantité qui peut varier au cours de la préparation de ces résines est la grandeur du diamètre des particules (« mesh range »). Elle joue un grand rôle dans la vitesse d'écoulement, et ainsi, plus les grains sont petits, et plus ils jouent un rôle efficace et le volume de résine nécessaire pour une opération donnée est diminué.

Le Dowex 50X2 (Cie Dow Chemical, Midland, Michigan) est lavé avec HCl N et NaOH N ; la décantation est effectuée au bout d'une heure, ce qui permet l'élimination des particules trop fines qui freineraient la chromatographie. La résine est tamisée humide à travers des tamis de 120 et de 200 mesh ; 40 % de la résine sont constitués par une fraction située entre 120 et 200 mesh (0,160-0,074 mm) et 40 % passent à travers le tamis de 200 mesh mais non celui de 400 (0,074-0,038 mm). Des colonnes de Dowex 50X2 constituées uniquement avec ce dernier matériel ont des vitesses d'écoulement beaucoup plus faibles que les colonnes correspondantes de Dowex 50X4. Aussi avons-nous été obligés de faire un mélange comportant 50 % de matériel 120-200 mesh et 50 % de matériel 200-400 mesh.

Pour préparer les colonnes de Dowex 50X2, on traite plusieurs fois un volume donné du sel de sodium de la résine par des quantités égales d'une solution tampon de citrate et d'acétate de sodium 0,2 N et pH 5,1. Quand, après agitation et repos, le surnageant

est à pH 5,1, on introduit la résine dans la colonne par portions successives de 20 cm, en laissant chaque fois à la résine le temps de se tasser et on ne rajoute une autre portion de 20 cm que lorsque le tampon surnageant s'est écoulé. La résine dans la colonne repose sur un clou de verre recouvert d'une rondelle de papier filtre. A pH 5,1 et 0,2 N, son degré de gonflement est maximum. Si on remplissait la colonne avec la résine en suspension dans la soude, elle augmenterait de volume sous l'effet du tampon à pH 5,1 et 0,2 N et se fendillerait.

On lave la résine, en colonne, avec de la soude 0,2 N contenant 0,5 % d'une solution de Brij 35, solution préparée en dissolvant 50 g de Brij 35 (alcool polyoxyéthylène laurique) dans 100 g d'eau chaude. Ensuite, on tamponne la résine à pH 2,2 ou 3,1.

Les cinq solutions tampons utilisées au cours de la chromatographie sont décrites dans le *tableau II* et contiennent surtout du citrate et de l'acétate de sodium. La normalité est calculée par rapport à la concentration en ions sodium. Nous avons eu soin de les préparer peu de temps avant emploi.

La solution qui contient le mélange propre à être chromatographié est ajustée à pH 2,2 et elle est introduite lentement avec une pipette. On a soin de ne pas détruire l'horizontalité de la surface. La colonne est tamponnée soit à pH 2,2, soit à pH 3,1, toujours avec une solution tampon 0,2 N, mais dans les deux cas, on commence la chromatographie avec la solution tampon pH 3,1, 0,2 N.

L'appareillage comprend :

- a) la colonne, soit de $150 \times 0,9$ cm pour les essais préliminaires, soit de 150×2 cm pour la séparation quantitative des peptides. Dans les deux cas, elle est entourée d'une jaquette d'eau permettant d'opérer à température constante ; il est indispensable, pour reproduire les résultats, d'opérer toujours à la même température connue ;
- b) un réservoir d'eau, maintenue à température constante grâce à un thermomètre Vertex et à un relais ; l'eau est envoyée dans la jaquette par une pompe ;
- c) un collecteur de fractions permettant de recueillir l'éluat par fractions de 1 à 10 ml grâce à une électrode mobile ;
- d) le sommet de la colonne est mis en communication soit avec une ampoule contenant la solution tampon, soit avec un dispositif permettant d'augmenter graduellement le pH et la concentration en ions Na^+ du tampon contenu dans la chambre

TABLEAU II

pH	N	Tampon	Acide citrique H ₂ O (g)	Acide acétique glacial (g)	NaOH (97 %) (g)	Acétate Na (g)	HCl concentré (ml)	Volume final (l)	Brij (%)
2,2 ± 0,03	0,2	citrate Na, E	21		8,4		16	1	0,5
3,1 ± 0,03	0,2	citrate Na, F	21		8,4		11,55	1	0,5
5,1 ± 0,02	2,0	citrate-acétate Na, G	105	21,5	47	136		1	0,1
6,6	2,0	acétate Na, H		2,5		272		1	0,1
4,2 ± 0,02	1,0	citrate-acétate Na, I	78,75	5,4	33,75	34	28,9	1	0,3

de mélange (de 0,5 l pour les petites colonnes et de 2 l pour les grandes) posée sur un agitateur magnétique. Le contenu de la chambre, constamment agité, est relié à une ampoule contenant la solution tampon de molarité et de pH plus forts ; l'ensemble du dispositif doit être étanche et à chaque goutte qui s'écoule au bas de la colonne d'analyse correspond une goutte tombant dans la chambre de mélange.

1. SÉPARATION DES PEPTIDES D'UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DU LYSOZYME DÉNATURÉ :

La *figure 3* rend compte des résultats obtenus au cours d'une première série d'expériences (50). L'hydrolyse trypsique est effectuée, sur 25 μ M de protéine dénaturée, pendant 6 heures, à 37° et à pH 7,8 dans les conditions décrites plus haut. L'action enzymatique est stoppée en ajustant le pH à 4 avec de l'acide acétique à 30 %. Une quantité aliquote prélevée à ce moment est chromatographiée sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A ; nous avons pu ainsi nous rendre compte que l'hydrolyse s'est effectuée normalement. Avant de charger l'hydrolysat sur la colonne de Dowex 50X2 de 135 $\times$ 2 cm, préalablement tamponnée à pH 3,1 et 0.2 N, nous l'avons acidifié avec HCl 2N jusqu'à pH 2.2. La vitesse est de 20 ml par heure et les fractions recueillies dans un collecteur automatique de fractions sont de 5 ml. La chromatographie est effectuée à 35°. Après passage de 0,75 l de la solution tampon F, le gradient est mis en route. La chambre de mélange contient 2 l de la solution F et la solution G est ajoutée goutte à goutte. Le pH croît rapidement et atteint 5 après écoulement de 3,5 l. A ce moment, pour augmenter plus rapidement la concentration en ions Na⁺, le volume de la chambre de mélange est réduit d'abord à 1 l (après écoulement de 4 l de solution tampon sur la résine), puis à 0,5 l (après 5 l). Pour terminer la chromatographie, nous avons élevé la température de l'eau circulant dans la jaquette à 50° et le gradient est remplacé par la solution tampon H.

Pour localiser les peptides (ou éventuellement les acides aminés) dans les fractions de 5 ml recueillies après passage des tampons sur la colonne de Dowex 50X2, nous avons eu recours à la méthode de dosage par le réactif à la ninhydrine selon MOORE et STEIN [46].

a) Dans une fraction sur deux, 0,3 ml est prélevé ; après addition de 1 ml de réactif et chauffage d'un quart d'heure au bain-

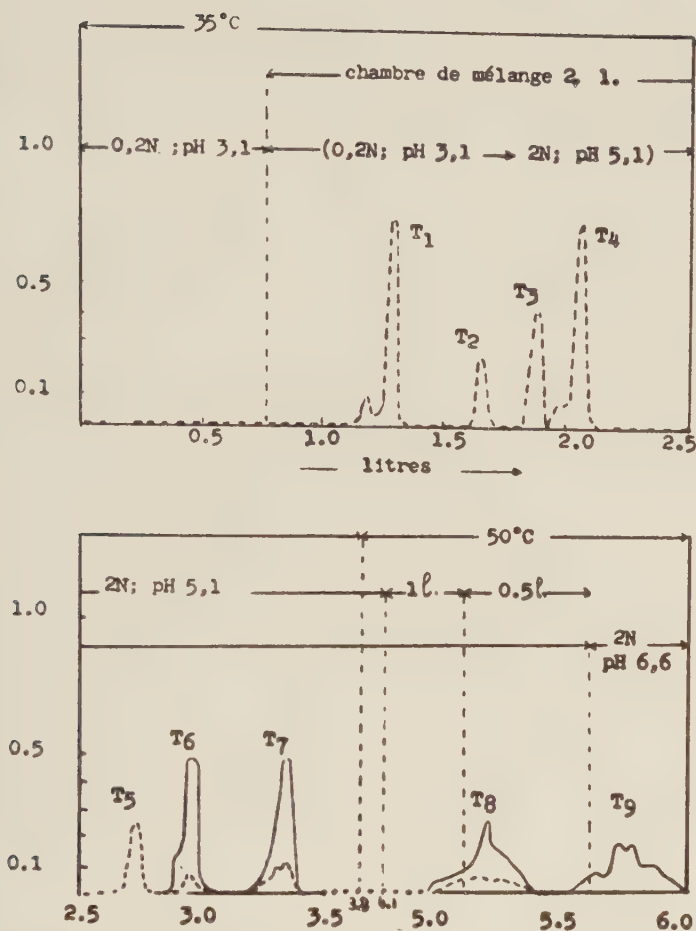


FIG. 3. — Séparation sur Dowex 50 $\times$ 2 des peptides contenus dans l'hydrolysate trypsique de 6 h à 37°C de $25\text{ }\mu\text{M}$ de lysozyme dénaturé

———— Coloration Ninhydrine après hydrolyse alcaline
 - - - - - Coloration Ninhydrine directe
 exprimées en conc. mM d'équivalents Leucine

marie bouillant, chaque tube est dilué avec 5 ml d'alcool à 50 % et la coloration est lue au photomètre Coleman à $570\text{ m}\mu$. Chaque ml du réactif contient 20 mg de ninhydrine, 3 mg d'hydrindantine

préalablement dissous dans 0,75 ml de méthylcellosolve (redistillé sur Cl_2Sn) auquel on ajoute 0,25 ml d'une solution tampon d'acétate de sodium 4 N et de pH 5,5. Cette quantité de tampon à forte molarité suffit pour amener le pH de chaque tube à 5, pH nécessaire pour le dosage. Sur la *figure 3*, la courbe en traits tirés rend compte de la « coloration ninhydrine directe », exprimée en concentration millimoléculaire d'équivalents leucine.

b) Dans un grand nombre de cas, ce procédé s'est révélé insuffisant. En effet, tous les peptides ne réagissent pas également bien avec la ninhydrine, et souvent un dosage direct ne permet pas de les repérer avec précision et d'une manière infaillible. C'est pourquoi nous avons également fait un dosage après hydrolyse en milieu alcalin. Bien que ce genre d'hydrolyse ait de nombreux inconvénients (destruction de certains acides aminés, par exemple), il a été adopté de préférence à l'hydrolyse en milieu chlorhydrique, où il est extrêmement difficile, lorsque l'on est en présence d'un grand nombre d'échantillons à doser, d'empêcher une absorption d'ammoniac qui fausse les résultats. A une prise de 0,3 ml d'une fraction de 5 ml, nous avons ajouté, dans un tube en pyrex, 1 ml de soude 2,5 N. Le tube non bouché est chauffé pendant 2,5 heures dans un bain d'huile à 90°. Le contenu se trouve concentré à 0,1-0,2 ml. Après refroidissement, 1 ml d'acide acétique à 30 % (en volume) suffit à neutraliser la soude et à ramener le pH à 5. Le dosage est continué comme il a été indiqué plus haut. Sur la *figure 3*, la courbe en trait plein rend compte de la coloration ninhydrine après hydrolyse alcaline. De l'augmentation de cette coloration par rapport à celle obtenue sans hydrolyse préalable, il a été possible de se faire une idée approximative du nombre de résidus d'acides aminés constituant le peptide.

La chromatographie sur Dowex 50X2 de pH 3,1 et 0,2 N à pH 6,6 et 2 N de l'hydrolysats tryptique du lysozyme dénaturé a ainsi donné naissance à 9 fractions ou pics différents : T1 à T9 [50] (*fig. 3*). L'élution en milieu alcalin a montré qu'une partie de la protéine mise sur la colonne est restée adsorbée sur la résine. Parmi les peptides de cette fraction se trouvent ceux de la cystine. En effet, des expériences préliminaires avaient montré que ces peptides restaient, dans les conditions de chromatographie qui viennent d'être décrites, accrochés au Dowex 50X2. Par contre, si l'on transforme par oxydation les 5 résidus de cystine contenus dans le lysozyme en 10 résidus d'acide cystéique, les peptides contenant ce nouvel acide aminé deviennent aptes à être chromatographiés.

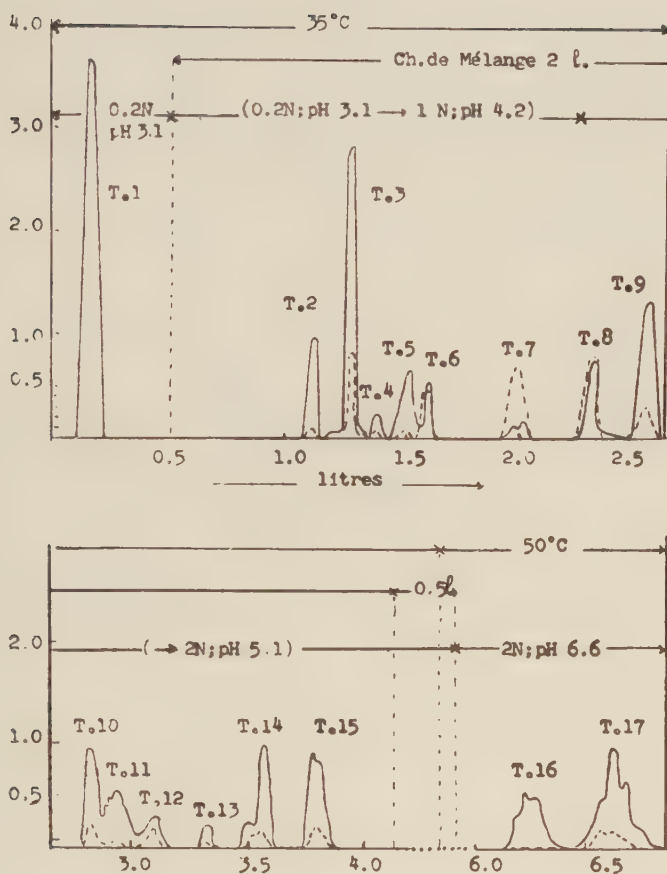


FIG. 4. -- Séparation sur Dowex 50 X 2 des peptides contenus dans l'hydrolysât trypsique de 6 h à 37°C de 25 μ M de lysozyme oxydé

———— Coloration Ninhydrine après hydrolyse alcaline
 - - - - - Coloration Ninhydrine directe
 exprimées en conc. mM d'équivalents Leucine

2. SÉPARATION DES PEPTIDES D'UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE DU LYSOZYME OXYDÉ :

La figure 4 montre les pics obtenus par hydrolyse trypsique de 6 heures à 37° de 25 μ M de lysozyme oxydé. Ces pics, au nombre de 17, T₀1 à T₀17, sont repérés comme il vient d'être décrit dans le cas du lysozyme dénaturé, les colorations obtenues

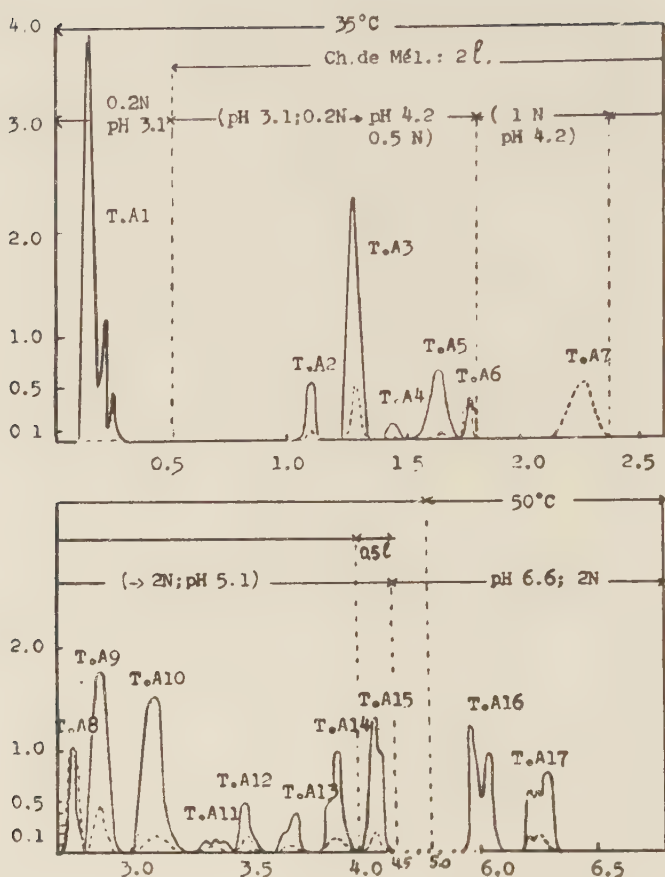


FIG. 5. — Séparation sur Dowex 50 $\times$ 2 des peptides contenus dans l'hydrolysats trypsique de 24 h à 37°C de 25 μ M de lysozyme oxydé

— Coloration Ninhydrine après hydrolyse alcaline
 - - - - - Coloration Ninhydrine directe
 exprimées en conc. mM d'équivalents Leucine

par un dosage direct à la ninhydrine ou après hydrolyse alcaline étant toujours exprimées en concentration millimoléculaire d'équivalents leucine. La chromatographie est effectuée à 35° et le seul changement introduit ici est l'utilisation d'un gradient plus doux. En effet, après écoulement de 0,5 l de la solution tampon F, on augmente la concentration en ions Na^+ et le pH en ajoutant

goutte à goutte la solution I à la solution F se trouvant dans la chambre de mélange de 2 l. C'est seulement après passage de 2,5 l que la solution I a été remplacée par le tampon G. Après 5,5 l, la température est élevée à 50° et on fait passer sur la résine le tampon H. En fin d'opération, la résine est traitée par NaOH 0,2 N et ainsi est éluée la fraction restée adsorbée (T_{018} , T_{019} et T_{020}). Elle est beaucoup plus petite que dans le cas du lysozyme dénaturé, ce qui est normal, les peptides de la cystine n'étant plus adsorbés.

La *figure 5* montre les pics obtenus par hydrolyse de 24 heures à 37° de 25 μ M de lysozyme oxydé. Une durée d'hydrolyse plus longue n'augmente pas le nombre des pics, qui sont toujours de 17 (T_{0A1} à T_{0A17}). Seule leur importance varie ; par exemple, T_{0A5} est plus grand que T_{05} tandis que T_{0A11} et T_{011} varient en sens inverse. Au cours de cette expérience, nous avons employé un gradient encore plus doux en vue de séparer éventuellement des peptides qui risquaient d'être confondus dans le même pic. A la solution tampon F (pH 3,1 ; 0,2 N), nous avons ajouté une solution pH 4,2 ; 0,5 N (tampon I dilué deux fois). Aucune nouvelle fraction n'a cependant pu être déterminée.

CHAPITRE IV

Purification des peptides de l'hydrolysat trypsique

Avant de déterminer la composition qualitative et quantitative des divers peptides de l'hydrolysat, nous avons tenu à vérifier si chaque pic des *figures 3, 4 et 5* correspondait à un seul peptide ou non. Pour vérifier la pureté d'une fraction, divers procédés peuvent être utilisés.

a) La rechromatographie sur colonne de résine dans des conditions légèrement différentes permet, parfois, la séparation de deux peptides contenus dans le même pic. Les conditions changées sont le plus souvent la concentration en ions Na^+ et la température. Nous avons appliqué cette méthode dans le cas du peptide T3, provenant d'un tout premier essai de chromatographie dans lequel T3 et T4 étaient restés confondus. Nous avons utilisé une colonne de $150 \times 0,9$ cm de Dowex 50X2 tamponnée à pH 3,1, et 0,2 N (tampon F). Les fractions conservées à la chambre froide sont amenées à pH 2,2 avec HCl 2 N, puis elles sont diluées de façon que la concentration en ions Na^+ soit 0,2 N. Dans le cas contraire, la résine diminuerait trop rapidement de volume, ce qui nuit à une bonne séparation. Par contre, même un volume important de liquide (jusqu'à 25 ml sur une colonne de $150 \times 0,9$ cm et jusqu'à 300 ml sur une colonne de 150×2 cm) peut être chargé si les conditions de pH et de concentration en ions Na^+ sont observées ; le peptide est ainsi concentré à la surface de la colonne et les pics, à la sortie, ne sont, de ce fait, nullement étalés. Dans le présent essai, le gradient est mis en route dès le début. La chambre de mélange est de 0,5 l, contenant le tampon F. C'est une solution tampon pH 5,1 et 0,4 N et non plus 2 N (tampon G) qui est ajoutée goutte à goutte. La température est toujours 35°. Nous

avons pu isoler trois pics en opérant comme il a été indiqué dans le Chapitre III : T3, T3 *bis* et T4. T3 *bis* est obtenu avec un très faible rendement et il n'en a pas été tenu compte dans l'étude des peptides du lysozyme dénaturé par chauffage. On le retrouvera avec un rendement plus fort, dans le pic T₀5 ou T₀A5. Néanmoins, cette séparation a permis de purifier complètement T4.

b) Mais le plus souvent, nous avons vérifié la pureté des pics en les soumettant à deux chromatographies sur papier dans deux solvants différents et à des ionophorèses sur papier à deux pH différents, d'une façon analogue à celle que nous avons déjà décrite.

Les peptides, au sortir de la colonne, se trouvent dans des solutions tampons : aussi les sels doivent-ils être préalablement éliminés.

Deux modes de dessalification sont employés, suivant que les peptides sortent de la colonne avant ou après la mise en route du gradient.

1° La dessalification des pics élués avec la solution tampon F (pH 3,1 ; 0,2 N) est faite sur Dowex 2 selon DRÈZE et BOECK [51]. 50 ml peuvent être dessalifiés sur une colonne de 25 × 1,8 cm. On laisse gonfler dans l'eau la résine tamisée préalablement à travers un tamis de 120 mesh. Puis elle est lavée dans un bécher avec de l'eau, HCl N, de l'eau, NaOH 2 N décarbonatée et de nouveau avec de l'eau. Entre les différents lavages, on laisse la résine se déposer et on décante le surnageant. Introduite dans la colonne, la résine repose sur un clou de verre. Elle est lavée par 30 ml de HCl N, 60 ml d'eau et enfin par 60 ml de NaOH 2 N décarbonatée. La fraction qui doit être dessalifiée est alors chargée sur la colonne. On lave la résine avec 100 ml d'eau et on élue le ou les peptides avec de l'acide acétique N en recueillant des fractions de 5 ml. La résine, en milieu acide, vire du jaune brun au jaune clair, et on peut ainsi suivre le front de l'acide. Quand il atteint le bas de la colonne, on continue à recueillir quelques fractions de 5 ml. L'acide acétique peut alors être remplacé par l'acétate d'ammonium N, acidifié à pH 3 avec de l'acide acétique. L'acétate pourrait éventuellement éluer des peptides trop fortement accrochés à la résine. Cette dernière est régénérée par lavage avec 60 ml de HCl N, 100 ml d'eau et 60 ml de NaOH 2 N et peut de nouveau servir. Nous avons utilisé cette méthode pour dessalifier les pics T₀1 et T₀A1.

2° La dessalification des pics élués après la mise en route du gradient est faite sur Dowex 50X2, en utilisant la fraction 120-

200 mesh. Nous avons simplifié la technique de HIRS, STEIN et MOORE [18] et opérons de la façon suivante : la résine, préparée comme cela a été décrit dans le cas de la colonne d'analyse de l'hydrolysats trypsique, est introduite dans la colonne en suspension dans une solution tampon pH 5,1 et 0,2 N (tampon G dilué 10 fois). 40 ml peuvent être dessalifiés sur une colonne de 25×2 cm, même si la concentration du tampon atteint 2 N. La résine est d'abord lavée avec NH_4OH 2 N jusqu'à alcalinité, puis avec de l'eau, enfin avec de l'acide citrique 0,1 M jusqu'à pH 3. La fraction à dessalifier est alors chargée, puis la résine est lavée avec 100 ml d'eau. L'élution du ou des peptides est faite avec NH_4OH N et elle est achevée avec de l'acétate d'ammonium 0,2 N. On recueille des fractions de 10 ml. La régénération de la résine se fait par lavage en colonne avec HCl 4 N, de l'eau, de l'ammoniaque 2 N, de l'eau et de l'acide citrique 0,1 M.

La localisation des peptides dans les différentes fractions recueillies à la sortie des colonnes de dessalification se fait de la même façon pour tous les pics : un vingtième de chaque fraction est évaporé à sec dans un dessiccateur sur soude ou sur acide sulfurique. Après chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A et révélation par le réactif à la ninhydrine, nous avons pu facilement repérer le ou les tubes contenant les peptides. Dans la plupart des cas, la première fraction acide (Dowex 2) ou la première fraction alcaline (Dowex 50) contient tout le peptide dessalifié. Un dosage à la ninhydrine fait sur une fraction aliquote après hydrolyse alcaline a montré que l'élution est quantitative. Seuls les peptides contenus dans les pics T₆, T₇, T₀12 (et T₀A12), T₀13 (et T₀A13), T₀14 (et T₀A14), T₀15 (et T₀A15) ne sont pas élués par NH_4OH N mais par l'acétate d'ammonium 0,2 N.

La ou les fractions contenant les peptides sont évaporées à sec dans un dessiccateur sur soude ou sur acide sulfurique concentré, afin d'éliminer les éluants. Les peptides peuvent alors subir divers critères de pureté.

Le *tableau III* rend compte du comportement des peptides T₁ à T₉ et T₀1 à T₀20 (ou T₀A1 à T₀A20) par chromatographie sur papier Whatman n° 1, dans le solvant A, pendant 16 heures à 20°, et par ionophorèse pendant 2 heures, sous 750 volts (15 volts/cm), sur papier Whatman n° 1 à pH 6,5 (solvant C) et à pH 3,6 (solvant D). Seules les fractions T₀1 (ou T₀A1); T₀3 (ou T₀A3); T₀14 (ou T₀A14); et T₀15 (ou T₀A15) se sont révélées formées d'un mélange de deux peptides lorsqu'on les chromatographie dans le solvant A.

TABLEAU III

Peptides	Chromato- graphie A (R _F)	Iono- phorèse (C) (m)*	Iono- phorèse (D) (m)*	Coloration après ninh.
T1	0,71	0	0	violet
T2		— 0,4	0	jaune
T3	pic NH ₃			
T4	0,05	+ 1	+ 1	violet
T5	0,07	+ 1	+ 1	violet
T6	0,03	+ 0,7	+ 0,85	br. puis v.
T7	0,05	+ 0,6	+ 0,65	jaune
T8	0,04	+ 0,05	+ 0,7	violet
T9	0,01	0	+ 0,3	violet
T ₀ 1 (ou A 1)a	0,02	— 0,3		j. br. puis v.
b	0,06	— 0,5	— 0,15	violet
T ₀ 2 (ou A 2)	0,02	— 0,3	— 0,1	j. br. puis v.
T ₀ 3 (ou A 3)a	0,07	— 0,5	0	j. br. puis v.
b	0,71	0	0	violet
T ₀ 4 (ou A 4)	0	— 0,35		violet
T ₀ 5 (ou A 5)	0,11	0		jaune
T ₀ 6 (ou A 6)	0	— 0,23	+ 0,18	violet
T ₀ 7 (ou A 7)	pic NH ₃			
T ₀ 8 (ou A 8)	0,05	+ 1	+ 1	violet
T ₀ 9 (ou A 9)	0,06	0	+ 0,4	jaune
T ₀ 10 (ou A10)	0,03	0	+ 0,6	br. puis v.
T ₀ 11 (ou A11)	0,015	— 0,45	0	violet
T ₀ 12 (ou A12)	0,30	+ 0,45	+ 0,5	violet
T ₀ 13 (ou A13)	0,03	+ 0,4		jaune
T ₀ 14 (ou A14)a	0,03	+ 0,7	+ 0,85	br. puis v.
b	0,07	+ 1	+ 1	violet
T ₀ 15 (ou A15)	0,05	a + 0,6 b + 0,7	+ 0,65	jaune violet
T ₀ 16 (ou A16)	0,04	+ 0,05	+ 0,7	violet
T ₀ 17 (ou A17)	0,01	0	+ 0,3	violet
T ₀ 18 (ou A18)	0	— 0,42	— 0,2	jaune
T ₀ 19 (ou A19)	0			jaune
T ₀ 20 (ou A20)	0	— 0,42		jaune

* m : mobilité du peptide calculée par rapport à celle de l'arginine pour les peptides cheminant vers la cathode (mobilité de l'arginine = + 1), ou calculée par rapport à celle de l'acide cystéique pour les peptides cheminant vers l'anode (mobilité de l'acide cystéique = — 1).

Dans aucun cas, l'ionophorèse n'a permis de déceler la présence de souillures visibles, mais certains peptides réagissant mal à la ninhydrine risquaient de nous échapper. Pour cette raison, nous avons eu habituellement recours à une chromatographie préparative ou à une ionophorèse préparative de chacun des peptides dessaliés. Nous n'avons soumis à des études de structure que les peptides purifiés qui donnent la même composition quand ils sont élués ou bien de deux chromatogrammes préparatifs dans deux solvants différents ou bien d'un chromatogramme préparatif et d'une ionophorèse préparative.

L'étude des *tableaux I et III* permet déjà de constater que T1 correspond à T₀3b (ou T₀A3b); T4 à T₀8 (ou T₀A8); T5 à T₀14b (ou T₀A14b); T6 à T₀1 et à T₀14a (ou T₀A14a); T7 à T₀2 et à T₀15a (ou T₀A15a); T8 à T₀16 (ou T₀A16); T9 à T₀17 (ou T₀A17). Les analyses de tous ces peptides confirmeront ces résultats.

CHAPITRE V

Analyse qualitative et quantitative des peptides de l'hydrolysats trypsique

L'analyse qualitative doit précéder toute analyse quantitative d'un peptide. La première opération dans cette détermination est l'hydrolyse acide totale : 0,025 à 0,1 μ M du peptide dessalifié est hydrolysé par 0,1-0,2 ml de HCl 6 N redistillé trois fois, dans un tube scellé, à 110°, pendant 24 heures. Ce temps peut être plus ou moins long suivant les constituants du peptide. Après refroidissement, le tube est ouvert et son contenu, dilué par un même volume d'eau, est amené à sec dans un dessiccateur contenant du chlorure de calcium et de la soude en pastilles. L'hydrolysats est alors chromatographié sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A, en même temps qu'une gamme témoin. Cette gamme contient les acides aminés suivants en quantités équimoléculaires : cystine, lysine, histidine, arginine, acide aspartique, acide glutamique, alanine, tyrosine, valine, phénylalanine et leucine. On révèle la gamme témoin par le réactif à la ninhydrine. On découpe pour l'échantillon à étudier, des bandes situées respectivement au niveau des acides aminés basiques, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique et de la leucine. Le reste de la feuille est révélé avec le réactif à la ninhydrine et la présence éventuelle d'alanine, de tyrosine, de valine et de phénylalanine est déterminée. Les bandes découpées sont éluées avec de l'eau. L'éluat provenant du niveau des acides aminés basiques est amené à sec et rechromatographié dans le phénol tamponné à pH 4 [52] sur papier Whatman n° 1 également tamponné à pH 4. On sépare ainsi par ordre de R_f croissant : acide cystéique, lysine, histidine et arginine. Les éluats provenant des niveaux de l'acide aspartique et de l'acide glutamique et amenés à sec, sont chromatographiés tous les deux, mais séparément, dans le phénol tamponné à pH 10 [52], sur du papier Whatman n° 1 préalable-

ment tamponné à pH 10. On sépare ainsi, toujours par ordre de R_f croissant : d'une part acide aspartique, sérine et glycolle, et d'autre part, acide glutamique et thréonine. Enfin la séparation entre leucine et isoleucine est achevée dans le n-butanol tamponné à pH 4 [52]. La proline et la méthionine sont révélées sans pulvérisation préalable de ninhydrine, par leurs réactifs spécifiques, respectivement à base d'isatine [53] et d'iodoplatinate [54]. L'arginine, l'histidine et la tyrosine peuvent être repérées, avant ou après pulvérisation de la ninhydrine, grâce aux réactifs de SAKAGUCHI [55], de PAULI [1] et de GERNGROSS [55] sur le peptide soit entier, soit hydrolysé. Comme le tryptophane est détruit par hydrolyse acide, sa présence est recherchée sur le peptide entier en pulvérisant le réactif d'EHRlich [56], réaction qui peut se faire aussi bien avant qu'après développement à la ninhydrine.

Le *tableau IV* rend compte des résultats qualitatifs obtenus avec les différents peptides, dont la purification a été décrite dans le chapitre précédent [50].

Mis à part la cystine et le tryptophane, l'oxydation performique n'a en rien touché les différents acides aminés, et en particulier la tyrosine n'a subi aucune transformation. Le tryptophane a donné naissance à un de ses dérivés d'oxydation — sans doute la kynurénine — qui réagit cependant sur papier avec le réactif d'Ehrlich comme le tryptophane lui-même, mais en donnant une tache de couleur orange. Contrairement à ce qui se passe avec le tryptophane, le dérivé résultant de l'oxydation n'est pas détruit par hydrolyse acide et la révélation spécifique peut être effectuée même après cette opération. C'est ce qui résulte d'essais témoins dans lesquels le comportement du tryptophane libre et du glycyl-1-tryptophane ont été étudiés.

L'analyse quantitative du nombre de résidus de chaque acide aminé présent dans un peptide donné peut être faite par chromatographie soit sur papier, soit sur colonne de Dowex 50.

L'analyse quantitative sur papier nécessite les mêmes opérations que celles qui viennent d'être décrites pour l'analyse qualitative, mais tous les chromatogrammes comportent une gamme d'acides aminés en proportion croissante selon POLSON [57] et la comparaison des taches obtenues après révélation à la ninhydrine permet de déterminer grossièrement si les résidus présents dans un peptide sont dans les rapports 1 : 1, 1 : 2 ou 1 : 3.

L'analyse quantitative sur colonne de résine échangeur d'ions fait appel au Dowex 50X4. Le Dowex 50X8 [58] a été abandonné car tous les peptides tryptiques (à l'exception d'un seul)

TABLEAU IV

COMPOSITION QUALITATIVE DES PEPTIDES T1 à T9 ET T₀1 à T₀20

T1 :	Leu libre
T2 :	non étudié, rendement inférieur à 5 % ; présence de Try
T3 :	NH ₃
T4 :	Lys libre
T5 :	Arg libre
T6 :	Asp, Arg
T7 :	Thr, Ser, Pro, Gly, Arg
T8 :	Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Leu, Tyr, Lys, His, Arg
T9 :	Asp, Thr, Ser, Glu, Ala, Phe, Arg
T ₀ 1a :	CySO ₃ H, Asp, Thr, Ser, Pro, Ala, Val, Ileu, Leu, Lys
b :	Asp, Thr, Ser, Gly, Ala, (MetO ₂ ?), Lys
T ₀ 2 :	CySO ₃ H, Asp, Thr, Ser, Ala, Val, Ileu, Lys
T ₀ 3a :	CySO ₃ H, MetO ₂ , Glu, Ala, Leu, Lys
b :	Leu libre
T ₀ 4 :	CySO ₃ H, Asp, Thr, Ser, Glu, Ala, Ileu, Leu, Lys
T ₀ 5 :	Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ileu, Leu, Tyr
T ₀ 6 :	CySO ₃ H, Lys
T ₀ 7 :	NH ₃
T ₀ 8 :	Lys libre
T ₀ 9 :	CySO ₃ H, Gly, Leu, Arg
T ₀ 10 :	CySO ₃ H, MetO ₂ , Glu, Ala, Leu, Lys, Arg
T ₀ 11 :	Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ileu, Leu, Tyr, Arg
T ₀ 12 :	Gly, Val, Phe, Arg
T ₀ 13 :	Asp, Ser, Arg
T ₀ 14a :	Asp, Arg
T ₀ 14b :	Arg libre
T ₀ 15a :	Thr, Ser, Pro, Gly, Arg
T ₀ 16 :	Asp, Ser, Glu, Gly, Ala, Leu, Tyr, Lys, His, Arg
T ₀ 17 :	Asp, Thr, Ser, Glu, Ala, Phe, Arg
T ₀ 18	/
T ₀ 20	\ tous les acides aminés avec Try oxydé

Les peptides T₀ et T₀A ont la même composition qualitative

contiennent un acide aminé basique. Or la chromatographie sur une colonne de 100 × 0,9 cm de Dowex 50X8 ne permet que la séparation des acides aminés acides et neutres. La détermination des acides aminés basiques doit être faite, avec un hydrolysats spécial.

sur une colonne de $15 \times 0,9$ cm. Cette méthode exigeait trop de matériel. Par contre, la méthode de MOORE et STEIN utilisant le Dowex 50X4 [43] permet, en une seule opération, de doser quantitativement tous les acides aminés. L'appareillage et les solutions tampons sont les mêmes que ceux déjà décrits et qui nous ont servi à chromatographier les peptides de l'hydrolysats tryptique. La colonne de résine de $150 \times 0,9$ cm est préparée comme celle de Dowex 50X2 ; $0,5$ à $1 \mu\text{M}$ de peptide est hydrolysé 24 heures dans $\text{HCl } 6 \text{ N}$, en tube scellé, à 110° , soit avant, soit après dessalification. En vue de déterminer la simple composition de la majorité des peptides étudiés dans le présent travail, il n'était pas nécessaire de s'assurer d'obtenir des valeurs très précises pour les acides aminés détruits par hydrolyse acide et nous n'avons pas analysé les hydrolysats après des temps de chauffage différents. La présence de sels inorganiques en faibles quantités ne gêne pas la détermination des acides aminés sur les colonnes échangeurs d'ions, et quelques analyses ont pu être faites sans séparation préalable du peptide et de la solution tampon. Un excès de sels, cependant, a souvent pour effet d'étaler les pics, surtout ceux correspondant à l'acide aspartique, à la thréonine et à la sérine. Dans le plus grand nombre de cas, nous avons travaillé avec des peptides dessaliés. L'hydrolysats évaporé plusieurs fois à sec en milieu aqueux pour chasser l'acide chlorhydrique et ensuite en milieu légèrement alcalin sur acide sulfurique pour chasser l'ammoniac, est ajusté très soigneusement à pH 2,2, puis est chargé sur la colonne préalablement tamponnée à pH 3,1 par la solution tampon F. La température est maintenue à 30° jusqu'à la sortie du pic correspondant à la sérine. La chromatographie est continuée à 50° et un gradient de pH et de concentration en ions Na^+ (pH 3,1 ; $0,2 \text{ N}$ à pH 5,1 ; 2 N) est mis en route après la sortie du pic correspondant à l'alanine, la chambre de mélange étant de 500 ml. En fin d'opération (après passage de 550 ml de solution tampon), la température est élevée à 75° pour l'élution de l'arginine. La colonne d'analyse est montée sur un collecteur automatique de fractions, chaque fraction correspondant à 1 ml. Une fraction sur deux est dosée par le réactif à la ninhydrine décrit dans le chapitre III [46]. La reproductibilité des résultats est très grande et une expérience témoin avec un mélange synthétique a permis de déterminer, une fois pour toutes, pour le lot de résine utilisé, la place des pics correspondant aux différents acides aminés. A titre d'exemple, nous donnons les courbes de séparation des acides aminés contenus dans les pics T_{03a} et T_{09} (fig. 6 et 7).

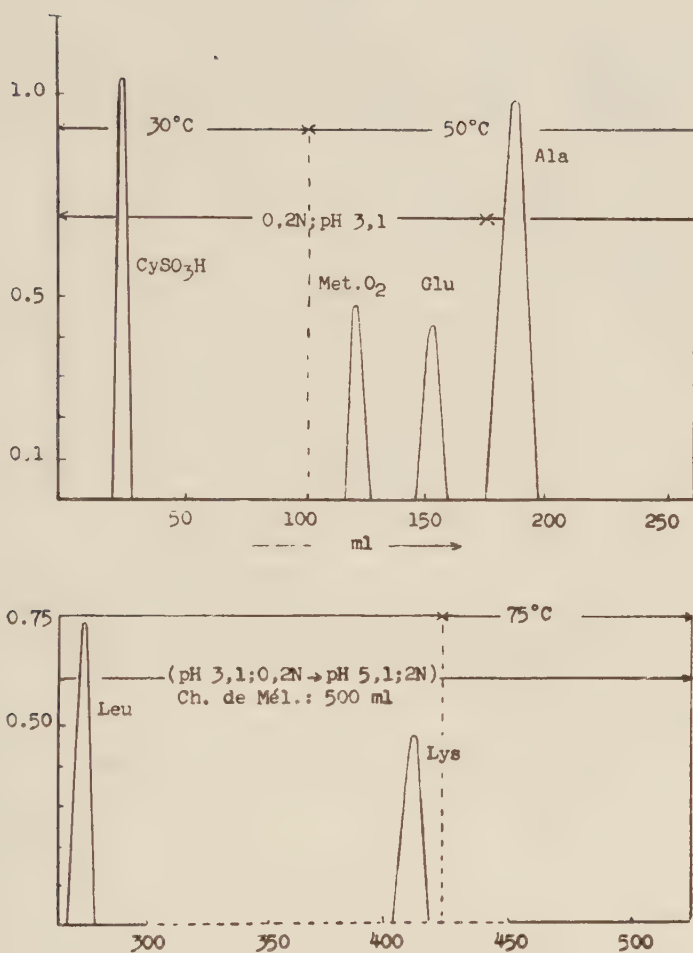


FIG. 6. — Analyse quantitative par chromatographie sur Dowex 50X4 de $0,9 \mu\text{M}$ de T_03a , après hydrolyse de 24 h à 110°C dans $\text{HCl } 6 \text{ N}$

Les colorations lues au photomètre Coleman sont exprimées en micromolécules au moyen d'une courbe témoin établie pour la leucine. Une micromolécule d'un autre acide aminé ne donne pas avec la ninhydrine, dans les mêmes conditions, une coloration identique. Aussi, pour la commodité des calculs, ramène-t-on toutes les colorations à celle de la leucine, au moyen de coefficients établis une fois pour toutes. Ces coefficients ont été calculés par

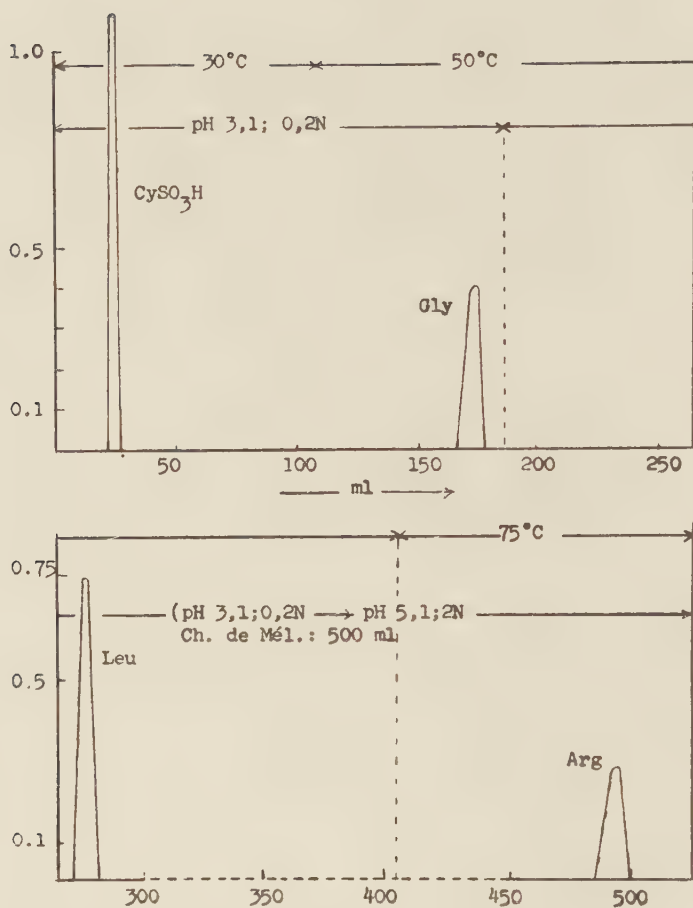


FIG. 7. — Analyse quantitative par chromatographie sur Dowex 50X4 de $0.8 \mu\text{M}$ de T_9 après hydrolyse de 24 h à 110°C dans HCl 6 N

MOORE et STEIN [46] et nous les avons vérifiés en grande partie. Le tableau V donne la valeur de ces coefficients. La quantité de l'acide aminé le moins représenté dans un peptide est prise comme unité : il est ainsi facile de déduire le nombre de résidus de chacun des acides aminés constituant et la formule de chaque peptide. Les valeurs de la sérine ont été augmentées de 10 %, celles de la thréonine de 5 % pour tenir compte de la destruction de ces deux acides aminés pendant l'hydrolyse acide.

TABLEAU V

RENDEMENT DE LA COLORATION NINHYDRINE
DE DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS PAR RAPPORT A LA LEUCINE

Acide aspartique ..	0,94	Leucine	1,00
Thréonine	0,94	Tyrosine	1,00
Serine	0,95	Phénylalanine	1,00
Acide glutamique ..	0,99	Lysine	1,10
Glycocolle	0,95	Histidine	1,02
Alanine	0,97	Tryptophane	0,94
Valine	0,97	Arginine	1,01
Méthionine	1,02	Acide cystéique ...	0,99
Isoleucine	1,00	Méthionine sulf. ..	1,02

(Les déterminations ont été faites sur des échantillons de 1 ml dans les solutions tampon utilisées au cours de la chromatographie sur Dowex 50X4; temps de chauffage: 15 minutes; coloration lue à 570 m μ .)

Le *tableau VI* rend compte de la composition quantitative des peptides obtenus après hydrolyse trypsique du lysozyme dénaturé et du lysozyme oxydé et aussi du rendement de chacun d'entre eux. Le rendement de chaque peptide par molécule de lysozyme a pu être calculé à partir des courbes de séparation des peptides après des temps d'hydrolyse de 6 et de 24 heures, en supposant qu'un peptide donné n'est présent qu'une seule fois dans la molécule de protéine. Il a été vérifié que chaque pic des *figures 3, 4* et *5*, à l'exception toutefois des pics T₀1 (ou T₀A1); T₀3 (ou T₀A3); T₀14 (ou T₀A14) et T₀ 18 à T₀20 (ou T₀A18 à T₀A20), ne contient qu'un seul constituant principal. Sachant que dans nos conditions expérimentales 1 μ g de leucine correspond à une coloration de 20, donc 1 μ M de leucine à une coloration de 2620, et connaissant la coloration totale d'un pic (après hydrolyse alcaline), la quantité de protéine initiale (25 μ M) et le nombre de résidus r du peptide contenu dans le pic, le rendement ρ en pour cent peut être facilement calculé :

$$\rho = c/r \times 1/2620 \times 100/25$$

Il ressort du *tableau VI*, avant toute étude de structure, que tous les pics T₀ sont identiques aux pics T₀A. La même observation peut être faite pour T1 et T₀3b, pour T4 et T₀8, pour T5 et T₀14b, et pour T6 à T9 et T₀14a à T₀17.

Dans le cas du lysozyme dénaturé, seuls les 9 pics d'un rendement supérieur à 10 % (T1 à T9) ont été analysés. Ainsi se trou-

TABLEAU VI

COMPOSITION QUANTITATIVE DES PEPTIDES T, T₀ ET T₀A

T1 : Leu libre (50)
T2 : non étudié, rendement inférieur à 5 %
T3 : NH ₃
T4 : Lys libre (92)
T5 : Arg libre (40)
T6 : Asp ₁ , Arg ₁ (45)
T7 : Thr ₁ , Ser ₁ , Pro ₁ , Gly ₁ , Arg ₁ (36)
T8 : Asp ₃ , Ser ₁ , Glu ₁ , Gly ₁ , Ala ₁ , Leu ₁ , Tyr ₁₋₂ , Lys ₁ , His ₁ , Arg ₁ (17)
T9 : Asp ₃ , Thr ₂ , Ser ₁ , Glu ₂ , Ala ₁ , Phe ₂ , Arg ₁ (25)
T ₀ 1 (ou A 1)a : CySO ₃ H ₂ , Asp ₄ , Thr ₁ , Ser ₃ , Pro ₁ , Ala ₃ , Val ₁ , Ileu ₂ , Leu ₃ , Lys ₁
T ₀ 2 (ou A 2) : CySO ₃ H ₁ , Asp ₂ , Thr ₁ , Ser ₃ , Ala ₂ , Val ₁ , Ileu ₁ , Lys ₁ (6 ; 6)
T ₀ 3 (ou A 3)a : CySO ₃ H ₁ , (MetO ₂) ₋₁ , Glu ₁ , Ala ₃ , Leu ₁ , Lys ₁ (35 ; 35) b : Leu libre (15 ; 15)
T ₀ 4 (ou A 4) : CySO ₃ H ₁ , Asp ₃ , Thr ₁ , Ser ₁ , Glu ₁ , Ala ₁ , Ileu ₁ , Leu ₁ , Lys, (5 ; 5)
T ₀ 5 (ou A 5) : Asp ₂₋₃ , Thr ₁₋₂ , Ser ₂ , Glu ₁ , Gly ₂ , Ileu ₂ , Leu ₁ , Tyr ₁ (8 ; 10)
T ₀ 6 (ou A 6) : CySO ₃ H ₁ , Lys ₁ (35 ; 26)
T ₀ 7 (ou A 7) : NH ₃
T ₀ 8 (ou A 8) : Lys libre (78 ; 92)
T ₀ 9 (ou A 9) : CySO ₃ H ₁ , Gly ₁ , Leu ₁ , Arg ₁ (58 ; 64)
T ₀ 10 (ou A10) : CySO ₃ H ₁ , (MetO ₂) ₋₁ , Glu ₁ , Ala ₃ , Leu ₁ , Lys ₁ , Arg ₁ (17 ; 30)
T ₀ 11 (ou A11) : Asp ₄ , Thr ₂ , Ser ₂ , Glu ₁ , Gly ₂ , Ileu ₂ , Leu ₁ , Tyr ₁ , Arg ₁ (7 ; 5)
T ₀ 12 (ou A12) : Gly ₁ , Val ₁ , Phe ₁ , Arg ₁ (16 ; 27)
T ₀ 14 (ou A14)a : Asp ₁ , Arg ₁ (79 ; 86) b : Arg libre
T ₀ 15 (ou A15)a : Thr ₁ , Ser ₁ , Pro ₁ , Gly ₁ , Arg ₁ , (60 ; 85)
T ₀ 16 (ou A16) : Asp ₃ , Ser ₁ , Glu ₁ , Gly ₁ , Ala ₁ , Leu ₁ , Tyr ₁₋₂ , Lys ₁ , His ₁ , Arg ₁ (19 ; 25)
T ₀ 17 (ou A17) : Asp ₃ , Thr ₂ , Ser ₁ , Glu ₂ , Ala ₁ , Phe ₂ , Arg ₁ (25 ; 25)

Les rendements en pour cent après des hydrolyses de 6 heures (peptides T, T₀) et de 24 heures (peptides T₀A) respectivement sont indiqués entre parenthèses.

vaient placés environ 30 acides aminés sur les 128 que comporte la protéine entière. C'était déjà une nette amélioration par rapport aux peptides purifiés au cours du travail préparatoire d'isolement sur papier, comprenant 4 peptides avec environ 15 acides aminés.

Enfin dans le cas du lysozyme oxydé, 17 pics d'un rendement au moins égal à 5 % ont été isolés. Parmi ceux-ci se trouvent tous les pics, déjà repérés dans le cas du lysozyme dénaturé, sauf T2.

7 des 9 pics supplémentaires contiennent, comme il fallait s'y attendre, des résidus d'acide cystéique, l'oxydation des résidus de cystine en résidus d'acide cystéique rendant la chromatographie possible. Les 2 pics T_05 et T_012 avaient dans le cas du lysozyme dénaturé un rendement trop faible. Les rendements sont plus importants dans le cas du lysozyme oxydé que dans le cas du lysozyme seulement dénaturé (T_6 : 46 % ; T_{014a} : 79 %, par exemple) et ils augmentent en général avec le temps de l'hydrolyse trypsique (T_9 passe de 58 à 64 % en T_{0A9} . T_{015a} de 60 à 85 % en T_{0A15a}). Une seule exception, très importante toutefois : le rendement en leucine libre, qui est de 50 % dans le cas du lysozyme dénaturé, tombe à 15 % dans le cas du lysozyme oxydé.

Notons pour terminer que parmi les peptides purifiés par chromatographie sur Dowex 50X2 et obtenus avec un bon rendement, un seul contenait du tryptophane, d'ailleurs sous sa forme oxydée ; c'est le peptide T_{018} qui est élué avec NaOH 0,2 N et ensuite purifié par ionophorèse sur papier. Les pics T_{0A18} à T_{0A20} contiennent également un peptide ayant du tryptophane oxydé parmi ses constituants et des constantes analogues à celles de T_{018} . Dans le travail préliminaire d'isolement sur papier, un autre peptide, T_4 , contenait un résidu de tryptophane. Il a été vérifié dans le cas du lysozyme dénaturé, qu'aucun autre peptide des *tableaux IV* ou *VI* obtenu avec un bon rendement ne présente de tryptophane, et dans le cas du lysozyme oxydé, aucun produit de dégradation de cet acide aminé n'a pu être caractérisé. On peut en tirer les conclusions suivantes : ou bien certains peptides contenant le tryptophane ou son produit de dégradation ont tendance à rester adsorbés sur la résine ; il faudrait alors utiliser soit des colonnes plus courtes, soit des solutions tampons à pH alcalin et à forte molarité ; ou bien un grand nombre de résidus de tryptophane font partie du peptide signalé plus haut ; ou bien le produit d'oxydation du tryptophane se détruit ou se transforme pendant l'hydrolyse acide et sa présence n'a de ce fait pas été remarquée. En tout cas, nous nous sommes efforcés de prouver que les peptides du lysozyme oxydé, dont la structure sera établie dans la deuxième partie, ne contiennent pas de tryptophane. Dans le cas du lysozyme dénaturé, il a été plus facile de démontrer l'absence de cet acide aminé grâce à la réaction d'Ehrlich faite sur le peptide entier.

DEUXIÈME PARTIE

**ETUDE DE LA STRUCTURE DES PEPTIDES
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE**

L'hydrolyse trypsique du lysozyme n'a donné naissance qu'à trois acides aminés libres : la leucine, la lysine et l'arginine. Nous expliquerons plus loin quelle place est la leur, si l'on juge ce résultat en fonction de la spécificité de la trypsine. Cette deuxième partie du présent travail est uniquement consacrée à l'étude de la structure des peptides. Dans le cas du lysozyme dénaturé, en plus des acides aminés libres et du pic NH_3 , 4 peptides seulement (T6 à T9) [50] ont été obtenus avec un rendement supérieur à 10 %, la présence de T2 étant signalée uniquement à cause du tryptophane qu'il contient. L'étude de leur structure complète sera exposée dans le premier chapitre de cette deuxième partie, alors que le deuxième chapitre traitera de 9 des 15 peptides obtenus en plus des acides aminés libres et de NH_3 dans le cas du lysozyme oxydé [50]. Dans tous les cas, nous supposerons connue la composition des peptides [60] établie dans la première partie de ce travail.

CHAPITRE I

Structure des 4 peptides de l'hydrolysat trypsique du lysozyme dénaturé

T6 : Asp (NH₂) . Arg

La structure de ce dipeptide est déterminée de la façon suivante : l'acide aminé N-terminal est obtenu par la méthode de SANGER [61] : 0,7 μ M du peptide est dissous dans 0,1 ml d'eau ; on ajoute 0,1 ml d'une solution de dinitrofluorobenzène (DNFB) à 2 % dans l'acétone et le pH est ajusté à 8 par addition d'une solution diluée de triméthylamine (TMA). On agite pendant 3 heures à température ordinaire dans un tube scellé. L'excès de DNFB est éliminé par extraction à l'éther en milieu alcalin et l'excès de TMA par évaporation à sec, sous vide, dans un dessiccateur sur acide sulfurique concentré. Après acidification, le dinitrophénol est extrait par l'éther, et le dérivé dinitrophénylé du peptide (DNP-peptide), acido-soluble, reste dans la phase aqueuse. En chromatographiant 0,1 μ M de ce DNP-peptide dans le solvant A, on s'aperçoit qu'une grande partie du peptide initial a échappé à l'action du DNFB. On prépare le DNP-peptide pur ($R_f = 0,55$) grâce à une chromatographie préparative sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A, suivie d'une élution. Le DNP-peptide est hydrolysé 8 heures à 110° dans HCl 6 N ; le DNP-acide aminé est extrait par l'éther et on identifie DNP-Asp par chromatographie sur papier Schleicher et Schule 507 dans le solvant J (en volume) : phénol-alcool isoamylique-eau (100-100-100) [62]. La fraction acidosoluble contient uniquement de l'arginine. La structure du peptide initial est donc : Asp . Arg.

Pour déterminer si Asp est amidé ou non, on étudie le comportement du peptide par ionophorèse sur papier à pH 6,5 en utili-

sant le mélange C. Sa mobilité par rapport à l'arginine est + 0,7, et correspond à celle d'un dipeptide basique. Si l'on avait affaire au peptide Asp . Arg, il serait neutre par compensation et de mobilité nulle. Le peptide initial est donc : Asp (NH₂) . Arg. On peut encore vérifier cette structure en le soumettant à une désamidation. 0,2 μ M du peptide est dissous dans 0,1 ml de HCl 11,7 N et abandonné 24 heures à 37°. Le produit est amené à sec et soumis à une ionophorèse à pH 6,5. Cette fois le peptide a une mobilité nulle, donc une structure Asp . Arg et on note l'absence de Asp ou de Arg libres, ce qui est normal, un dipeptide résistant à une hydrolyse ménagée.

T7 : Thr . Pro . Gly . Ser . Arg

L'acide aminé N-terminal, Thr, est déterminé par la méthode de SANGER [61]. 0,15 μ M de peptide est dissous dans 0,1 ml d'eau. Nous avons ajouté 0,1 ml d'une solution de DNFB à 2 % dans l'alcool. Le DNP-peptide est obtenu de la façon classique. L'hydrolyse acide est faite à 110°, pendant 5 heures, dans HCl 6 N. Le DNP-acide aminé, éthéro-soluble, est identifié dans le solvant J [62] : il s'agit de la DNP-Thr. La fraction acidosoluble est encore hydrolysée pendant 16 heures et des chromatographies sur papier dans le solvant A et dans le phénol tamponné à pH 10 [52] nous ont montré qu'elle contient uniquement de l'arginine, de la sérine, du glycolle et de la proline.

D'autre part, nous avons utilisé le procédé de révélation de CIFONELLI et SMITH [63], modifié par LAURILA [40], pour les peptides commençant par la sérine ou la thréonine et nous avons ainsi vérifié que nous avons bien affaire ici à un peptide commençant par un hydroxyaminoacide.

Pour déterminer la structure complète de T7, nous avons d'abord essayé de le soumettre à une hydrolyse acide partielle, effectuée sur 1 μ M de produit, à 37°, pendant 48 heures et dans HCl 11,7 N. Les produits obtenus ont été séparés préparativement par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A. Nous avons obtenu un mélange complexe de peptides à faible rendement et des acides aminés libres. Les principaux peptides sont :

- I) $R_f = 0,07$; composition : Ser₁, Arg₁ ; le peptide est jaune après révélation à la ninhydrine, ce qui indique que sa structure serait : Ser . Arg.
- II) $R_f = 0,25$; composition : Thr₁, Pro₁, Gly₁.
- III) $R_f = 0,31$; composition : Thr₁, Pro₁.

La structure du peptide T7 paraît être : Thr . Pro . Gly . Ser . Arg.

Pour le vérifier, nous avons recommencé l'hydrolyse acide partielle sur le peptide T7 raccourci de son acide aminé N-terminal, grâce à la méthode d'EDMAN [64, 65] : 1 μ M de T7, en solution dans 0,2 ml d'eau est traitée avec 0,2 ml d'une solution de phényl-isothiocyanate à 1 % dans l'alcool à 95°. Le pH est ajusté à 9,5 avec une solution diluée de triméthylamine. On laisse reposer 30 minutes à 40° en agitant de temps en temps : l'excès de réactif est extrait avec du benzène et le phénylthiocarbamylpeptide (PTC-peptide) est amené à sec dans un dessiccateur sur acide sulfurique. On reprend par 0,2 ml d'un mélange : acide acétique-HCl (5-1 en volumes), et on laisse reposer à température ordinaire. Ce temps est suffisant pour que se détache, après cyclisation, le phénylthiohydantoïne-acide aminé (PTH-acide aminé) du peptide T7 qui se trouve ainsi raccourci d'un résidu de thréonine. Le PTH-acide aminé est extrait par l'acétate d'éthyle en milieu acide. La solution acide contient le nouveau tétrapeptide.

Le tétrapeptide résiduel, chromatographié dans le solvant A, a un $R_f = 0,05$. Révélé directement par le réactif à l'isatine [53], réactif spécifique des peptides commençant par la proline, il réagit fortement en bleu, ce qui indique que la proline est son acide aminé N-terminal. L'enchaînement N-terminal de T7 est donc Thr . Pro.

Le tétrapeptide est soumis à une hydrolyse acide partielle (37° ; 37 heures ; HCl 11,7 N) et les produits qui en résultent sont séparés et préparés par ionophorèse sur papier, à pH 6,5 dans le solvant C (2 heures ; 15 volts/cm). On obtient deux produits principaux : d'une part un peptide de mobilité nulle, de composition Gly, Pro, et réagissant en bleu avec le réactif à l'isatine [53]; sa structure est donc Pro . Gly ; d'autre part, un peptide basique, de mobilité + 0,7 et de composition Ser, Arg ; or ce peptide réagit positivement avec le réactif des hydroxyaminoacides [40]; sa structure est donc Ser . Arg. On remonte ainsi facilement à la structure du tétrapeptide : Pro . Gly . Ser . Arg et à celle du peptide T7 initial : Thr . Pro . Gly . Ser . Arg.

T8 : His . Lys . Glu . Asp . Ala . Tyr . Gly . Ser . Leu . Asp . Asp (NH₂) . Tyr . Arg

L'acide aminé N-terminal, His, a été déterminé par la méthode de SANGER [61] : 0,5 μ M est traité par le fluorodinitrobenzène. Au cours des extractions par l'éther en milieu acide, nous avons remarqué que le DNP-peptide, insoluble dans l'éther, l'est également

dans la phase acide et précipite. Après hydrolyse de 6 heures à 110° dans HCl 6 N, nous n'avons pu caractériser aucun DNP-aminoacide par chromatographie sur papier Schleicher et Schule dans le solvant J [62]. Sur papier Whatman n° 1 et dans le solvant A, nous avons repéré l' ϵ -DNP-lysine, l'imidazol-DNP-histidine et la O-DNP-tyrosine. Par hydrolyse de 2 heures à 110° dans HCl 11,7 N, nous avons pu caractériser dans le solvant J la di-DNP-histidine à l'exclusion de tout autre DNP-acide aminé et dans le solvant A l' ϵ -DNP-lysine et la O-DNP-tyrosine, mais il n'y a plus trace d'imidazol-DNP-histidine. La di-DNP-histidine est éluée de la feuille Schleicher et Schule par un mélange à volume égal, d'acétone et de HCl N et rechromatographiée dans la méthyl-éthylcétone saturée par une solution tampon de citrates et de phosphates 0,2 M, pH 6,2, sur papier Whatman n° 1 imprégné du même tampon. Dans ce solvant, le DNP-aminoacide élué se place au même niveau que la di-DNP-histidine témoin. Il est ainsi intéressant de noter qu'une hydrolyse acide ou trop prolongée ou effectuée dans HCl 6 N au lieu de 11,7 N transforme la di-DNP-histidine en imidazol-DNP-histidine.

L'hydrolyse acide partielle (37° ; 24 heures ; HCl 11,7 N) de 1 μ M de T8 nous a permis de caractériser jusqu'à présent les quatre fractions suivantes, que nous avons purifiées par ionophorèse sur papier (2 heures ; 750 volts ou 15 v/cm) dans le solvant C à pH 6,5, puis par chromatographie sur papier dans le solvant A (tableau VII).

TABLEAU VII

PEPTIDES VENANT D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DU PEPTIDE T8

Peptides	(m) *	(R _f)	Composition
I	+ 0,4	0,05	Asp ₂ , Leu ₁ , Tyr ₁ , Arg ₁
II	+ 0,4	0,17	Asp ₁ , Tyr ₁ , Arg ₁
III	+ 0,5	0,17	Tyr ₁ , Arg ₁
IV	— 0,65	0,55	Asp ₂ , Leu ₁

(*) m : mobilité telle qu'elle a été définie tableau III

Par la méthode de SANGER [61], nous avons trouvé que Tyr est placé en tête du peptide III, que Asp est l'extrémité N-terminale du peptide II, et Leu celle du peptide IV. L'ensemble des résultats donnés dans le tableau ci-dessus indique l'existence d'un enchai-

nement : Leu . Asp . Asp . Tyr . Arg. Comme nous savons que l'unique résidu d'histidine contenu dans le lysozyme est suivi d'un résidu de lysine [38], l'enchaînement N-terminal se trouve établi : His . Lys. La structure du peptide T8 peut donc s'écrire : His . Lys [(Glu, Asp, Ala, Tyr, Gly, Ser)] . Leu . Asp . Asp . Tyr . Arg.

En s'appuyant sur le fait que le lysozyme ne contient que 3 résidus de Tyr, que l'un d'entre eux se trouve à l'extrémité C-terminale de T8 et que le deuxième appartient au peptide T₀₁₁ qui ne contient pas d'alanine, le résidu de tyrosine contenu dans la parenthèse doit appartenir à l'enchaînement Asp . Ala . Tyr trouvé dans un hydrolysate chymotrypsique [40]. D'autre part, nous avons isolé dans l'hydrolysate pepsique du lysozyme natif deux peptides PA14 et PA15 dont les R_i dans le solvant A et les compositions sont respectivement : 0,43 et Asp₁, Ser₁, Gly₁, Leu₁, Tyr₁ ; 0,27 et Asp₂, Ser₁, Gly₁, Leu₁, Tyr₁. En faisant agir pendant 10 minutes à 37° et à pH 7,8 la carboxypeptidase sur ces peptides, nous avons détaché dans le cas de PA14 de l'acide aspartique et un peu de leucine, et dans le cas de PA15 de l'asparagine, un peu d'acide aspartique et une trace de leucine. Leurs structures seraient donc : (Tyr, Gly, Ser) . Leu . Asp pour PA14 et (Tyr, Gly, Ser) . Leu . Asp . Asp (NH₂) pour PA15. Enfin le dipeptide Tyr . Gly isolé d'un hydrolysate acide partiel [39] ne peut venir que de cette partie de la molécule. De tous ces résultats, il ressort que la structure de T8 serait : His . Lys . Glu* . Asp* . Ala . Tyr . Gly . Ser . Leu . Asp . Asp (NH₂) . Tyr . Arg.

T9 : Phe . Glu . Ser . Asp . Phe . Asp . Glu . Ala . Thr . Thr .
Asp . Arg

L'enchaînement N-terminal est déterminé par la méthode d'EDMAN [64, 65]) : 1,2 μ M de T9 est dissous dans 1 ml de pyridine à 50 % ; on ajoute 0,5 ml d'une solution fraîchement préparée de phénylisothiocyanate à 1 % dans l'alcool et on ajuste le pH à 9 avec de la triméthylamine. Les autres opérations sont analogues à celles décrites lors de l'établissement de la structure de T7. On extrait le PTH-acide aminé trois fois avec de l'acétate d'éthyle acide. La solution acide contient le peptide raccourci d'un acide aminé. Il est difficile de caractériser le PTH-acide aminé ; aussi

(*) Indiquent les résidus de Asp et de Glu pour lesquels nous n'avons pas encore déterminé s'ils existent sous forme d'acide aspartique ou glutamique, ou sous forme d'asparagine ou glutamine.

le soumet-on à une hydrolyse barytique ($\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,2 N) de 48 heures à 110° pour régénérer l'acide aminé lui-même. Après élimination de la baryte par précipitation sous forme de carbonate, l'acide aminé N-terminal, Phe, a été retrouvé par chromatographie sur papier dans le solvant A.

En vue de déterminer l'acide aminé N-terminal de T9 raccourci, on traite 0,1 μM de ce peptide par le réactif de SANGER dans les conditions décrites pour T6. Le DNP-peptide, qui est basique, est soluble en milieu acide. Amené à sec, il est hydrolysé par 0,5 ml de HCl 5,7 N pendant 7 heures à 110° en tube scellé. Après extraction à l'éther, on caractérise par chromatographie sur papier Schleicher et Schule 507 dans le solvant J [62] le DNP-Glu. Il est élué du papier par le mélange acétone- HCl N (1-1). L'éluat est évaporé à sec et rechromatographié dans un tampon citrate-soude M à pH 6,2 [66]. On caractérise à nouveau DNP-Glu. L'enchaînement N-terminal de T9 est donc : Phe . Glu.

1,1 μM de T9 raccourci est soumis, après dissolution dans 1 ml d'eau, à une hydrolyse chymotrypsique pendant 29 heures à 37° . Pour cela on ajoute 0,5 ml d'une solution contenant 2 000 μg de chymotrypsine par ml et le pH est ajusté à 7,5 avec NH_4OH 0,1 N. L'action enzymatique est arrêtée en amenant l'hydrolysat à sec et les différents peptides formés sont séparés et préparés par une chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A. Quatre peptides ont été isolés, analysés et étudiés (*tableau VIII*).

Enfin 0,25 μM du peptide initial T9 est soumis à une hydrolyse acide partielle (37° ; 26 heures; HCl 11,7 N). L'hydrolysat est chromatographié sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A et de très nombreux acides aminés libres, di- et tripeptides ont été repérés. Plusieurs peptides ont été isolés et étudiés après une chromatographie préparative (*tableau VIII*).

TABLEAU VIII

Peptides	(R _t)	Composition	Extrémité N-terminale
PEPTIDES VENANT D'UN HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DU PEPTIDE T9			
I	0,03	Asp ₂ , Glu ₁ , Thr ₂ , Ala ₁ , Arg ₁	Asp
II	0,07	Asp ₁ , Glu ₁ , Thr ₂ , Ala ₁ , Arg ₁	Glu
III	0,15	Asp ₁ , Glu ₁ , Ala ₁	
IV	0,27	Asp ₁ , Glu ₁ , Ala ₁ , Phe ₁	Phe
PEPTIDES VENANT D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DU PEPTIDE T9			
I	0,01	Asp ₁ , Arg ₁	Asp
II	0,27	Glu ₁ , Ala ₁	
III	0,43	Asp ₁ , Ser ₁ , Phe ₁	Ser
IV	0,63	Glu ₁ , Phe ₁	Phe

Le tableau IX récapitule les résultats décrits ci-dessus :

TABLEAU IX
STRUCTURE DU PEPTIDE T9

Phe . Glu									
	Ser . Asp . Phe								
		(Glu, Ala)							
			Asp . Arg						
		Phe . (Asp, Glu, Ala)							
		(Asp, Glu, Ala)							
		Asp . (Glu, Ala, Thr ₂ , Asp, Arg)							
		Glu . (Ala, Thr ₂ , Asp, Arg)							

La structure du peptide T9 peut en être aisément déduite :
Phe . Glu* . Ser . Asp* . Phe . Asp* . Glu* . Ala . Thr . Thr .
Asp* . Arg.

(*) Il n'a pas été déterminé si le résidu aspartique ou glutamique est amidé ou non.

Structure de quelques peptides de l'hydrolysats trypsique du lysozyme oxydé

T_{03a} : $CySO_3H$. Glu . Ala . Leu . Ala . Ala . MetO₂ . Lys

L'acide aminé N-terminal, $CySO_3H$, est déterminé par les méthodes de SANGER [61] et d'EDMAN [64, 65] en opérant chaque fois avec 0,2 μM de peptide. Dans le premier cas, après une hydrolyse de 7 heures, à 110°, dans HCl 6 N, nous avons caractérisé comme seuls DNP-aminoacides l'acide DNP-cystéique et l' ϵ -DNP-lysine ; dans le deuxième cas, le PTH-acide aminé formé est acido-soluble. En chromatographiant la phase aqueuse dans le solvant A et en révélant avec le réactif à l'iodoplatinate [54], nous avons caractérisé le PTH-acide cystéique.

1 μM de T_{03a} est soumis à une hydrolyse acide ménagée (37° ; 24 heures ; HCl 11,7 N). Les produits de cette réaction sont séparés par ionophorèse sur papier en utilisant le solvant C (pH 6,5 ; 2 heures ; 750 volts), puis purifiés par chromatographie dans le solvant A sur papier Whatman n° 1. Cinq fractions ont pu être analysées (voir *tableau X*).

Le peptide IV a été particulièrement étudié : par la méthode de SANGER [61], nous avons caractérisé l'acide aminé N-terminal, $CySO_3H$. Après avoir fait agir la carboxypeptidase sur le DNP-peptide (2 heures ; 37° ; pH 7,5), nous avons montré par chromatographie sur papier dans le solvant A qu'il se détache beaucoup de leucine et un peu moins d'alanine. Le DNP-peptide ainsi raccourci et hydrolysé (17 heures ; 110° ; HCl 6 N) donne naissance à de l'acide glutamique et à de l'acide DNP-cystéique. La structure de ce peptide est donc : $CySO_3H$. Glu . Ala . Leu. Il s'agit de l'enchaînement N-terminal du peptide T_{03a} .

TABLEAU X
PEPTIDES ISOLÉS A PARTIR D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL
DE T₀3a

Peptides	m*	R _t	Composition
I	+ 0,5	0,03	(MetO ₂) ₁ , Ala ₂ , Lys ₁
II	+ 0,4	0,05	(MetO ₂) ₁ , Lys ₁
III	0	0,20	(MetO ₂) ₁ , Ala ₂
IV	— 0,6	0,25	CySO ₃ H ₁ , Glu ₁ , Ala ₁ , Leu ₁
V	— 1,2	0,05	CySO ₃ H ₁ , Glu ₁

(*) m : mobilité telle qu'elle a été définie dans le *tableau III*.

Nous avons isolé également une substance de R_t = 0,43, donnant naissance après hydrolyse acide totale uniquement à de l'alanine. Il ne s'agit pas ici de l'alanine libre (R_t = 0,35) mais de la séquence Ala . Ala provenant de l'enchaînement Ala . Ala . Met . Lys.

Le *tableau XI* résume les résultats obtenus.

TABLEAU XI
STRUCTURE DU PEPTIDE T₀3a

CySO ₃ H	
CySO ₃ H . Glu	
CySO ₃ H . Glu . Ala . Leu	
	Ala, Ala
	Ala, Ala, MetO ₂
	Ala, Ala, MetO ₂ , Lys
	MetO ₂ , Lys

Sous réserve de présence de tryptophane, dont toutefois aucun produit de dégradation n'a pu être caractérisé, la structure complète de T₀3a peut facilement être déduite de tous ces résultats : CySO₃H . Glu* . Ala . Leu . Ala . Ala . MetO₂ . Lys.

(*) Il n'a pas été précisé si le peptide contient de l'acide glutamique ou de la glutamine.

T_{06} : $CySO_3H$. *Lys*

L'acide aminé N-terminal, $CySO_3H$ est déterminé par la méthode de SANGER [61]. La fraction soluble dans l'éther ne contient aucun DNP-aminoacide et dans la fraction acidosoluble, nous avons caractérisé, après chromatographie sur papier dans le solvant A, à côté de l'acide DNP-cystéique, uniquement de l' ϵ -DNP-lysine. La structure de T_{06} est donc : $CySO_3H$. *Lys*.

T_{09} : *Gly* . $CySO_3H$. *Arg* . *Leu*

Pour établir la structure de ce peptide, il a été procédé à la détermination des acides aminés N- et C-terminaux et à l'étude des peptides provenant de l'hydrolyse partielle acide. L'ensemble de ces résultats a été vérifié en déterminant l'ordre des acides aminés par la méthode de récurrence d'EDMAN [64, 65].

L'acide aminé N-terminal, *Gly*, a été caractérisé par la méthode de SANGER [61]. L'hydrolyse du DNP-peptide est effectuée pendant 2 heures, à 100°, dans HCl 11,7 N.

L'acide aminé C-terminal, *Leu*, a été identifié par action de la carboxypeptidase sur le peptide (37° ; pH 7,8 ; présence de diisopropylfluorophosphate). En chromatographiant sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A des parties aliquotes prélevées à des temps différents, on voit apparaître la leucine et un peptide, donnant une tache jaune après révélation à la ninhydrine, de $R_f = 0,01$, contenant le glycocolle, l'acide cystéique et l'arginine, alors que le peptide initial de $R_f = 0,06$ et donnant également une tache jaune après révélation à la ninhydrine, diminue dans les mêmes proportions.

L'hydrolyse acide partielle (37° ; 22 heures ; HCl 11,7 N) donne naissance à plusieurs produits isolés par ionophorèse sur papier Whatman n° 1 à pH 6,5 et dont la pureté a été vérifiée par chromatographie sur papier dans le solvant A. Connaissant la composition du peptide et ses acides aminés terminaux, on peut en déduire la structure des produits les plus abondants de l'hydrolysate, telle qu'elle est donnée dans le *tableau XII*.

De l'examen de ces résultats, il résulte que la structure de T_{09} ne peut être que *Gly* . $CySO_3H$. *Arg* . *Leu*.

La méthode de récurrence d'EDMAN [64, 65] a permis de constater qu'aucun autre acide aminé n'a échappé à l'analyse. Du peptide initial ont été détachés successivement le glycocolle et l'acide cystéique. A ce stade, le peptide résultant a été traité avec le réac-

tif de SANGER [61]. L'hydrolyse du DNP-peptide (110° ; 6 heures ; HCl 6 N) a donné naissance à la DNP-arginine et à la leucine. Ainsi se trouve confirmée la structure de T_{09} .

TABLEAU XII
PEPTIDES ISOLÉS A PARTIR
D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL DE T_{09}

Peptides	m*	R _f	Composition	Structure
I	+0,8	0,36	Leu ₁ , Arg ₁	Arg . Leu
II	—0,15	0,02	CySO ₃ H ₁ , Arg ₁	CySO ₃ H . Arg
III	—0,15	0,08	CySO ₃ H ₁ , Leu ₁ , Arg ₁	CySO ₃ H . Arg . Leu
IV	—0,8	0,02	CySO ₃ H ₁ , Gly ₁	Gly . CySO ₃ H

(*) m : mobilité telle qu'elle a été définie dans le tableau III.

T_{010} : CySO₃H . Glu . Ala . Leu . Ala . Ala . MetO₂ . Lys . Arg

En appliquant la méthode de SANGER [61] et en travaillant avec 0,2 μ M de T_{010} , nous avons pu caractériser, comme seuls DNP-aminoacides, l'acide DNP-cystéique et l' ϵ -DNP-lysine après une hydrolyse de 7 heures à 110° dans HCl 6 N.

L'hydrolyse acide partielle de 1,5 μ M (37° ; 24 heures ; HCl 11,7 N) a donné naissance à 7 peptides principaux que nous avons isolés par ionophorèse sur papier à pH 6,5 (2 heures ; 750 volts) en utilisant le solvant C. Chaque peptide a été de nouveau purifié sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A (tableau XIII).

TABLEAU XIII
PEPTIDES ISOLÉS D'UN HYDROLYSAT ACIDE PARTIEL
DU PEPTIDE T_{010}

Peptides	m*	R _f	Composition
I	+1,2	0	Lys ₁ , Arg ₁
II	+1	0	(MetO ₂) ₁ , Ala ₂ , Lys ₁ , Arg ₁
III	+0,7	0	(MetO ₂) ₁ , Lys ₁ , Arg ₁
IV	0	0,20	(MetO ₂) ₁ , Ala ₂
V	0	0,43	Ala ₂
VI	—0,6	0,25	CySO ₃ H ₁ , Glu ₁ , Ala ₁ , Leu ₁
VII	—1,2	0,05	CySO ₃ H ₁ , Glu ₁

(*) m : mobilité telle qu'elle a été définie dans le tableau III.

Le peptide VI a été étudié : nous avons déterminé l'acide aminé N-terminal, CySO_3H , par la méthode de SANGER [61], et l'acide aminé C-terminal, Leu, par action de la carboxypeptidase, sur le DNP-peptide.

Les divers résultats peuvent ici être résumés de la façon suivante (tableau XIV).

TABLEAU XIV
STRUCTURE DU PEPTIDE : T_{010}

CySO_3H	
$\text{CySO}_3\text{H} \cdot \text{Glu}$	
$\text{CySO}_3\text{H} \cdot (\text{Glu}, \text{Ala}) \cdot \text{Leu}$	
	(Ala, Ala)
	(Ala, Ala, MetO_2)
	(Ala, Ala, MetO_2 , Lys, Arg)
	(MetO_2 , Lys, Arg)
	Lys . Arg

Sous réserve de présence de tryptophane, dont toutefois aucun produit de dégradation n'a pu être caractérisé, la structure du peptide T_{010} peut facilement être déduite de tous ces résultats : $\text{CySO}_3\text{H} \cdot \text{Glu}^* \cdot \text{Ala} \cdot \text{Leu} \cdot \text{Ala} \cdot \text{Ala} \cdot \text{MetO}_2 \cdot \text{Lys} \cdot \text{Arg}$.

T_{012} : Val . Phe . Gly . Arg

L'acide aminé N-terminal a été déterminé par la méthode de SANGER [61]. Le DNP-peptide est hydrolysé 12 heures à 110° dans HCl 5,7 N. La phase soluble dans l'éther est analysée dans le solvant J [62]. On obtient une tache jaune se plaçant au niveau des DNP-Val et DNP-Phe témoins qui ont dans J le même R_f . L'analyse de la fraction acidosoluble a permis de caractériser uniquement les 3 acides aminés suivants : Gly, Phe et Arg. La valine manque dans cette fraction et c'est donc elle qui est l'acide N-terminal du peptide.

2 μM de T_{012} sont soumis à une hydrolyse acide partielle de 48 heures à 37° dans HCl 11,7 N. Les peptides résultant de cette opération sont préparés quantitativement sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A. Nous avons isolé les trois peptides suivants dont la composition a été établie :

(*) Il n'a pas été précisé si le peptide contient de l'acide glutamique ou de la glutamine.

- I) $R_f = 0,07$; composition : Gly₁, Arg₁. Sa couleur jaune après révélation à la ninhydrine indique que sa structure serait : Gly . Arg.
II) $R_f = 0,71$; composition : Val₁, Phe₁, Gly₁.
III) $R_f = 0,80$; composition : Val₁, Phe₁.

Ces résultats permettent d'établir la structure de T₀12 : Val . Phe . Gly . Arg.

La présence de tryptophane ou d'un de ses produits d'oxydation ou de dégradation a été exclue en déterminant la structure par la méthode de récurrence d'EDMAN [64, 65]) : 0,5 μ M est dissoute dans 0,3 ml d'eau ; on ajoute 0,2 ml d'une solution de phénylisothiocyanate à 1 % dans l'alcool et on ajuste le pH à 9 par une solution diluée de triméthylamine. Les autres opérations sont analogues à celles qui ont été décrites dans le cas du peptide T7. Nous avons procédé à trois opérations successives et avons caractérisé, dans l'ordre : Val (rendement 100 %), Phe (rendement 25 %) et des traces de Gly. A ce stade, la fraction acidosoluble a été analysée et ne contenait que de l'arginine libre. La structure de T₀12, établie ci-dessus, s'est donc trouvée vérifiée par un procédé différent.

T₀14a : Asp(NH₂) . Arg

T₀15a : Thr . Pro . Gly . Ser . Arg

T₀16 : His . Lys . Glu . Asp . Ala . Tyr . Gly . Ser . Leu . Asp .
Asp . (NH₂) . Tyr . Arg

T₀17 : Phe . Glu . Ser . Asp . Phe . Asp . Glu . Ala . Thr . Thr
Asp . Arg

La structure de ces quatre derniers peptides est identique à celle des peptides T6, T7, T8 et T9.

Avant de terminer cette partie du travail consacrée à la structure des peptides de l'hydrolysat trypsique du lysozyme, notons qu'au cours d'un travail préparatoire, il a été possible d'isoler sur papier, après précipitation alcoolique, et à partir du lysozyme dénaturé, un peptide de structure Val . Ala . Try . Arg (voir Tableau I : peptide T_r4, p. 22). La présence de Try a été décelée spécifiquement sur le peptide entier [56] ; par la méthode d'EDMAN [64, 65], il a été possible de détacher successivement : Val, Ala et Try. L'arginine libre a été retrouvée en fin d'opération. Ce peptide n'a pas été retrouvé après chromatographie de l'hydrolysat trypsique sur Dowex 50X2 ; il reste sans doute fortement adsorbé sur la résine par suite de la présence du tryptophane, et ne pourra être élué qu'en milieu fortement alcalin.

CHAPITRE III

Spécificité de la trypsine : application au lysozyme d'œuf de poule

La trypsine est un des meilleurs outils qui soit à notre disposition pour l'étude de la structure chimique des protéines. Il suffit pour cela de considérer la grande spécificité de ses coupures qui a été vérifiée dans un très grand nombre de cas, comme nous l'avions déjà noté dans l'introduction. Effectivement, dans le cas du lysozyme d'œuf de poule dénaturé ou oxydé, tous les peptides obtenus avec un bon rendement (supérieur à 20 %), à l'exception du seul T₀9, sont terminés soit par un résidu de lysine, soit par un résidu d'arginine. Seulement deux de ces peptides contiennent non pas un, mais deux résidus d'acides aminés basiques : T8 (ou T₀16) et T₀10. Dans le peptide T8, la trypsine n'a pas rompu la liaison peptidique suivant la lysine. On peut penser que cette exception est due soit à la présence de l'histidine, soit plutôt à la présence d'un groupement acide. Cette liaison semble ainsi particulièrement résistante à l'action de la trypsine et un phénomène analogue a été observé dans le cas de l'enchaînement N-terminal de la ribonucléase où l'enzyme n'a pas hydrolysé Lys . Glu [18, 67].

Le peptide T₀10 contient également deux résidus basiques, l'enchaînement C-terminal du peptide étant Lys . Arg ; ce peptide n'est d'ailleurs que le peptide T₀3a rallongé d'un résidu d'arginine. Au cours de l'étude de la structure de l'ACTH [6], il a été également constaté que la trypsine a quelque difficulté à couper les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de la lysine ou de l'arginine, si ces deux acides aminés sont suivis d'un autre acide aminé basique.

Il est intéressant, dans le même ordre d'idées, de noter l'action de l'enzyme sur l'enchaînement ...Arg . His . Lys... [38], His .

Lys étant l'enchaînement N-terminal du peptide T8 (ou T₀16). La trypsine n'a coupé qu'une seule fois, après Arg. Nous n'avons pas trouvé d'histidine libre, ni le peptide His . Lys. Si Lys n'était pas engagé dans une liaison très difficile à rompre, nous aurions probablement trouvé une certaine quantité de ce peptide.

Le peptide T₀9, Gly . CySO₃H . Arg . Leu . OH, est le seul peptide à fort rendement qui ne soit pas terminé par un acide aminé basique, mais par la leucine [60]. D'autre part, la leucine est le seul acide aminé non basique obtenu par action de la trypsine sur le lysozyme [60], aucun peptide sans lysine ou arginine n'ayant pu par ailleurs être décelé avec un bon rendement. Comme le même résultat est obtenu en faisant agir la carboxypeptidase sur la protéine [36, 37], il semble donc s'agir de la leucine C-terminale, qui doit être précédée d'un résidu d'arginine ou de lysine, à cause de la spécificité que possède la trypsine. Le peptide T₀9 semble satisfaire cette donnée et il est ainsi possible qu'il constitue l'enchaînement C-terminal de la protéine. Le rendement de leucine libre obtenue par hydrolyse tryptique de 6 heures à 37° du lysozyme dénaturé est de 50 %; ce rendement tombe à 15 % dans le cas du lysozyme oxydé. Ce résultat peut être expliqué par la présence, à côté de l'arginine, du groupement acide — SO₃H de l'acide cystéique qui semble inhiber partiellement l'action de la trypsine, comme en général tout groupement acide fixé sur le résidu voisin de Arg et de Lys.

Parmi les peptides à faible rendement, un seul (T₀5) ne contient pas d'acide aminé basique. Il pourrait être un produit de dégradation de T₀11, obtenu sans doute par action de la chymotrypsine qui souille la trypsine Worthington. En effet, il ne semble pas possible que l'enchaînement T₀5 puisse exister deux fois dans la molécule de lysozyme et qu'il soit un peptide principal obtenu par action de la trypsine et par là éventuellement un enchaînement C-terminal de la protéine. D'une part, le rendement est faible et d'autre part, il contient un résidu de tyrosine. Or le lysozyme n'en contient que trois : deux sont localisés dans le peptide T8 (ou T₀16), l'autre dans T₀11, dont T₀5 semble être précisément un morceau.

Enfin, nous pouvons noter en terminant ce chapitre qu'aucune réaction de transpeptidation ne semble intervenir au cours de l'hydrolyse tryptique telle que nous la pratiquons, bien que ces réactions soient à craindre dans toute expérience faisant appel aux enzymes protéolytiques. Deux considérations nous ont amenés à cette conclusion : d'une part presque tous les peptides sont obtenus

avec un rendement d'au moins 10 % ; il semble peu probable qu'un peptide résultant d'une réaction de transpeptidation soit obtenu avec un tel rendement ; d'ailleurs si l'on prolonge l'hydrolyse tryptique jusqu'à 24 heures, on retrouve les mêmes produits, et les mêmes seulement, que dans le cas d'une hydrolyse de 6 heures ; d'autre part, une transpeptidation par la trypsine conduirait très probablement à la formation de peptides ayant plus d'un résidu d'acide aminé basique par molécule. Or parmi le grand nombre de peptides étudiés, deux seulement contiennent deux acides aminés basiques. Les deux fois, nous avons pensé qu'il s'agit de liaisons que la trypsine hydrolyse difficilement non seulement dans le cas du lysozyme, mais aussi dans le cas d'autres protéines, comme la ribonucléase. Il semble donc improbable qu'elles puissent être facilement synthétisées par action de l'enzyme.

TROISIÈME PARTIE

STRUCTURE PARTIELLE DU LYSOZYME

La trypsine nous a permis de couper la molécule de lysozyme en un petit nombre de peptides (ou acides aminés) plus courts, terminés soit par un résidu de lysine, soit par un résidu d'arginine. Théoriquement, 11 peptides de l'arginine (ou l'acide aminé libre), 6 peptides de la lysine (ou l'acide aminé libre) et, si la molécule n'est pas terminée par un acide aminé basique, 1 peptide neutre (ou acide aminé non basique), devaient être formés. Pratiquement, nous avons déterminé la composition qualitative et dans la plupart des cas aussi la structure des peptides contenant d'une part les 6 résidus de lysine et d'autre part 9 des 11 résidus d'arginine. La dernière étape à franchir dans l'établissement de la structure partielle du lysozyme était de déterminer d'abord les enchaînements N- et C-terminaux de la protéine, et ensuite l'ordre de succession au sein de la molécule primitive des peptides formés par action de la trypsine. Ce dernier stade revient à l'étude de peptides contenant des acides aminés basiques qui, cependant, ne doivent occuper ni la position N-, ni la position C-terminale. Ces peptides peuvent par exemple être obtenus par hydrolyse acide partielle ou par hydrolyse enzymatique, en utilisant la pepsine ou la chymotrypsine.

Nous allons d'abord montrer comment nous avons déterminé les extrémités N- et C-terminales de la protéine ; puis nous étudierons l'action de la pepsine sur le lysozyme et nous terminerons par un résumé de nos connaissances actuelles sur la structure du lysozyme résultant du présent travail.

CHAPITRE I

Enchaînements N- et C-terminaux du lysozyme

ENCHAINEMENT N-TERMINAL

On sait que le lysozyme de blanc d'œuf de poule est constitué par une chaîne peptidique unique, comme l'ont montré d'une part les travaux de FRAENKEL-CONRAT [34] et d'autre part ceux se rapportant aux acides aminés terminaux de la protéine. GREEN et SCHROEDER [68], ainsi que THOMPSON [69] ont montré que l'acide aminé N-terminal est la lysine et la méthode de SANGER [61] a permis de conclure à la présence d'une molécule de cet acide aminé par molécule de protéine. En soumettant le DNP-lysozyme à une hydrolyse acide partielle et en étudiant les différents morceaux obtenus, SCHROEDER [35] a pu montrer que l'enchaînement N-terminal de la protéine est : Lys . Val . Phe . Gly. Nous avons déterminé cet enchaînement augmenté d'un résidu par la méthode d'EDMAN [64, 65] : 100 mg de carbonate de lysozyme ($6\text{ }\mu\text{M}$) sont dissous dans 5 ml de pyridine à 50 %; le pH est ajusté à 10 avec de la triméthylamine en solution diluée et on ajoute $120\text{ }\mu\text{M}$ de phénylthiocyanate. Pour la suite des opérations, nous avons procédé comme cela a été indiqué dans le cas du peptide T7. La caractérisation des phénylthiohydantoïnes étant délicate, nous avons, ici aussi, régénéré l'acide aminé correspondant par hydrolyse barytique de 48 heures à 110° . Au cours de 4 cyclisations, nous avons détaché successivement les phénylthiohydantoïnes de la lysine, de la valine, de la phénylalanine et du glycolle; les acides aminés régénérés ont été identifiés par chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A après hydrolyse barytique

et élimination de Ba par précipitation sous forme de carbonate. Le lysozyme raccourci de 4 résidus d'acides aminés est mis en suspension dans 5 ml d'alcool à 50 % et traité par le dinitrofluorobenzène, suivant la méthode de SANGER [61]. Le DNP-dérivé est hydrolysé en tube scellé dans 5 ml de HCl 5,7 N pendant 20 heures à 110°. L'hydrolysat est extrait par l'éther et on recherche les DNP-acides aminés dans les phases aqueuse et éthérée. Cette recherche est faite quantitativement afin de pouvoir distinguer le produit principal de la réaction des produits secondaires formés par suite de ruptures de liaisons peptidiques intervenues au cours des 4 cyclisations successives. Une colonne de 10 g de Hyflo-Supercel tamponnée à pH 6,2 et développée avec de la méthyl-éthylcétone saturée d'eau [70, 71] permet de séparer, à partir de la phase aqueuse, une bande jaune de $R_f = 0,6$. Par chromatographie sur papier d'une fraction aliquote dans le solvant A, on identifie ainsi la DNP-arginine. Une autre fraction aliquote a servi à un dosage quantitatif [72] et nous avons eu soin d'établir dans les mêmes conditions une courbe étalon de DNP-arginine. L'extrait éthéré est fractionné sur une autre colonne de Hyflo tamponnée à pH 7,7 et développée avec de l'acétate d'éthyle saturé d'eau. On obtient plusieurs bandes jaunes qui sont identifiées par chromatographie sur papier Schleicher et Schule 507 dans le solvant J [62]. Il s'agit essentiellement de DNP-Thr, DNP-Ser et DNP-Asp que nous avons dosés [72]. De tous ces résultats, nous avons pu conclure qu'une molécule de DNP-Arg est accompagnée de 0,14 mol. de DNP-Ser, de 0,13 mol. de DNP-Thr et de 0,12 mol. de DNP-Asp. Des coupures aberrantes s'effectuent donc en faible proportion au niveau des hydroxyaminoacides. Ceci explique peut-être que LANDMANN [73] utilisant uniquement la technique d'EDMAN ait observé une libération de serine à la cinquième scission. L'isolement du peptide : Val . Phe . Gly . Arg (T_0 12), après hydrolyse trypsique, confirme une fois de plus que l'enchaînement N-terminal de la protéine est : Lys . Val . Phe . Gly . Arg.

ENCHAINEMENT C-TERMINAL

En faisant agir la carboxypeptidase sur le lysozyme, THOMPSON [37] et HARRIS [36] ont montré que la leucine occupe la position C-terminale, dans les proportions d'une molécule d'acide aminé par molécule de lysozyme. En prolongeant l'action de la carboxypeptidase Worthington bien au delà du temps nécessaire pour

détacher la leucine terminale qui apparaît dès les premières minutes (rapport enzyme/substrat : 1/100), nous avons constaté qu'aucun autre acide aminé n'a pu être détecté dans le cas du lysozyme dénaturé ; dans le cas du lysozyme oxydé, de nombreux acides aminés apparaissent, mais en quantité négligeable. Notons que dans le cas du lysozyme natif, la leucine apparaît beaucoup plus difficilement et seulement après deux heures d'action de l'enzyme : toutes ces observations indiquent que la leucine terminale est immédiatement précédée d'un résidu d'acide aminé non détachable par la carboxypeptidase dans les conditions habituelles.

Nous avons montré [50] que par action de la trypsine sur le lysozyme dénaturé, on obtient avec un rendement de 50 % de la leucine libre. Cette leucine est d'ailleurs le seul acide aminé non basique qui a pu être caractérisé dans ces conditions, et de plus aucun peptide sans acide aminé basique n'a pu être isolé avec un fort rendement. D'après ce que l'on sait de la spécificité de la trypsine, on peut en conclure que l'acide aminé précédant immédiatement la leucine est soit la lysine, soit l'arginine : Arg . Leu . OH ou Lys . Leu . OH.

Nous avons répété cette expérience dans le cas du lysozyme oxydé. La seule fraction ne contenant pas d'acide aminé basique parmi ses constituants et obtenue avec un rendement supérieur à 10 % est de nouveau celle renfermant de la leucine libre. Le rendement (15 %) est cependant beaucoup plus faible que celui obtenu avec le lysozyme dénaturé, mais non oxydé. Il a paru alors intéressant de vérifier si tous les peptides à fort rendement de l'hydrolysats tryptique étaient vraiment terminés par un acide aminé basique, bien que tous en comportent parmi leurs constituants, et si la difficulté de rupture par la trypsine n'était pas due à un empêchement venant de l'oxydation performique. Effectivement, comme nous l'avons vu dans la deuxième partie de ce travail, le peptide T₉ [60] obtenu avec un rendement de 60 % a comme structure : Gly . CySO₃H . Arg . Leu. Ce peptide peut être regardé comme l'enchaînement C-terminal de la protéine, si l'on considère que la grande spécificité de la trypsine vérifiée et observée à maintes reprises, peut être appliquée également dans le cas présent. Le faible rendement en leucine libre dans le cas du lysozyme oxydé peut s'expliquer par la présence, à côté de l'arginine, du groupement acide-SO₃H de l'acide cystéique qui semble inhiber partiellement l'action de la trypsine. Cependant il serait également possible que cette même présence ait provoqué ici une coupure aberrante de la trypsine.

Quoi qu'il en soit, la leucine C-terminale de la protéine est en tout cas précédée d'un acide aminé basique ; il ne semble pas pour cette raison que l'enchaînement proposé par OHNO [74] soit exact. Les causes d'erreurs inhérentes [75] à l'utilisation de la méthode par hydrazinolyse [76, 77] employée par cet auteur peuvent expliquer cette divergence.

CHAPITRE II

Hydrolyse pepsique du lysozyme d'œuf de poule

D'après des travaux effectués sur des substrats synthétiques [78], on pouvait s'attendre à ce que la pepsine coupe de préférence les liaisons peptidiques impliquant des résidus d'acides aminés aromatiques. Mais la spécificité de la pepsine est loin d'égaliser celle de la trypsine et son action est beaucoup plus complexe, comme l'ont montré MOORE et STEIN dans leur travail sur la ribonucléase [18].

HYDROLYSE PEPSIQUE

L'action de la pepsine Worthington a été étudiée d'une part sur le lysozyme natif et d'autre part sur le lysozyme oxydé par l'acide performique et préparé comme il a été décrit dans la première partie. Dans les deux cas, l'hydrolyse pepsique est effectuée sur 20 μ M de protéine pendant 24 heures, à 37°, et à pH 2,2 dans la solution tampon E (voir *tableau II*). La concentration en protéine est de 1 % et le rapport enzyme/substrat de 1/100. L'action enzymatique est stoppée en ajustant le pH à 7 avec NaOH 2 N. Dans le cas du lysozyme natif, des prélèvements faits toutes les heures pendant 24 heures ont été soumis à des mesures d'activité. Après trois heures d'attaque pepsique, l'hydrolysât ne lyse plus une suspension standard de *Micrococcus lysodeikticus* [29], l'activité décroissant en fonction du temps.

SEPARATION DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT

La séparation des peptides (ou acides aminés) obtenus par hydrolyse pepsique du lysozyme est faite par chromatographie sur

colonne de Dowex 50X2 de 135×2 cm. L'hydrolysate dont le pH est ajusté à 2,2 est chargé sur la colonne tamponnée à pH 3,1 0,2 N par la solution tampon F. La chromatographie est faite à 35° avec une vitesse de coulée de 20 ml par heure. La colonne est montée sur un collecteur automatique de fractions et l'éluate est recueilli par portions de 5 ml. Dans le cas du lysozyme natif, après passage de 1,075 l de la solution tampon F, un gradient de pH et de concentration en ions Na^+ est mis en route (pH 3,1 ; 0,2 N à pH 4,1 ; 0,5 N). On ajoute goutte à goutte à la solution F contenue dans une chambre de mélange de 2 l le tampon I dilué 2 fois. Ce dernier est remplacé par la solution G après 2,575 l. Après écoulement de 4,5 l, l'éluate a un pH de 5. A ce moment, pour faire croître plus rapidement la concentration en ions Na^+ , nous avons réduit à 0,5 l le volume de la chambre de mélange. La chromatographie est terminée en faisant passer sur la résine la solution tampon H (pH 6,6 ; 2 N), à 50° , puis une solution de NaOH 0,2 N. La *figure 8* rend compte des résultats obtenus au cours de cet essai. Les pics sont repérés par un dosage à la ninhydrine après hydrolyse alcaline, opération effectuée exactement dans les conditions décrites dans la première partie pour localiser les pics de l'hydrolysate tryptique. 17 fractions (PA1 à PA17) ont pu ainsi être déterminées, sans compter la fraction obtenue par élution à la soude de la résine (PA18). Sur la *figure 8*, nous avons de nouveau porté en abscisse le volume de tampon écoulé et en ordonnée la « coloration ninhydrine », exprimée en concentration millimolaire d'équivalents leucine.

Après hydrolyse pepsique du lysozyme oxydé, 21 fractions ont été caractérisées (P_{01} à P_{021}). La chromatographie est faite comme ci-dessus, avec toutefois un changement : la solution tampon H est remplacée par diverses solutions tampons de phosphates 0,5 M et successivement de pH 6,5 ; 7,1 ; 7,6 et 7,85. Pour terminer l'opération, la résine est de nouveau élue par NaOH 0,2 N (*fig. 9*).

PURIFICATION DES PEPTIDES BASIQUES

Les fractions correspondant à un pic donné sont réunies et dessalifiées sur Dowex 50X2, dans les conditions déjà décrites pour les peptides de l'hydrolysate tryptique. Tous les peptides obtenus par action de la pepsine peuvent être élués au cours de la dessalification par NH_4OH N. Mais la plupart des pics contiennent

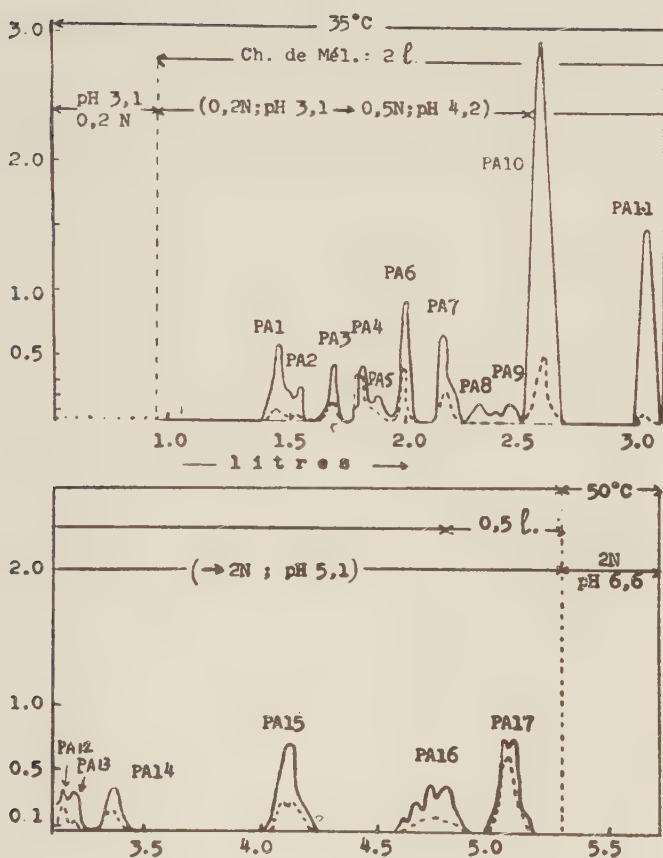


FIG. 8. — Séparation sur Dowex 50X2 des peptides contenus dans l'hydrolysât pepsique de 24 h à 37°C de 20 μ M de lysozyme natif

— Coloration Ninhydrine après hydrolyse alcaline
 - - - - - Coloration Ninhydrine directe
 exprimées en conc. mM d'équivalents Leucine

deux, quelques-uns même quatre, peptides différents. En effet, une quantité aliquote d'un pic dessalifié est chromatographiée sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A ; cette chromatographie répétée à une échelle préparative constitue une première purification, les peptides contenus dans un même pic ayant souvent des R_f très différents dans ce solvant. Mais cette purification peut ne pas être

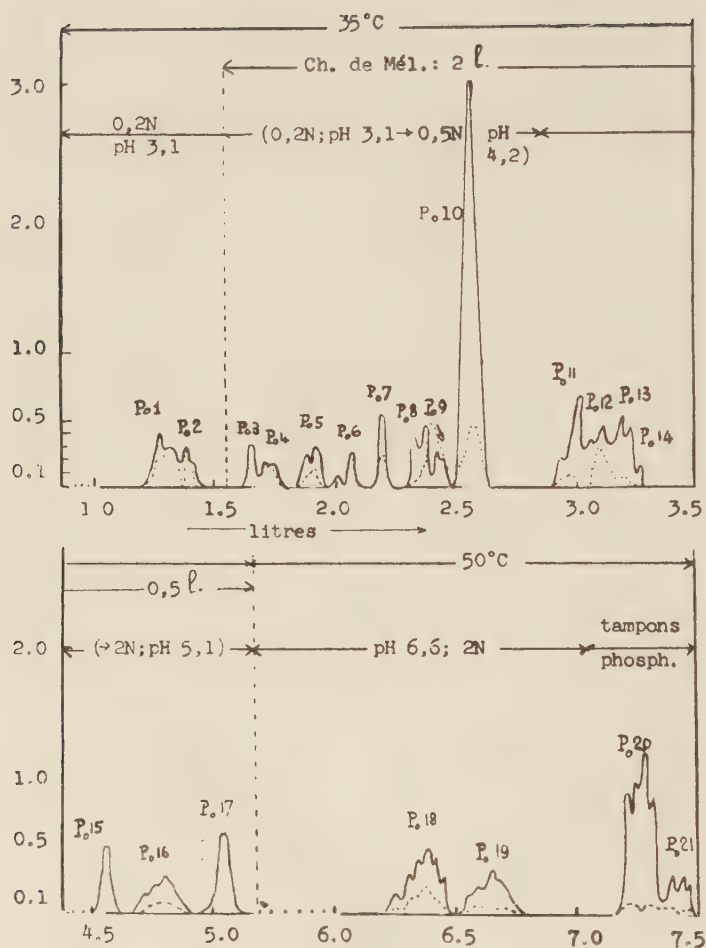


FIG. 9. — Séparation sur Dowex 50X2 des peptides contenus dans l'hydrolysats pepsique de 24 h à 37°C de 20 μ M de lysozyme oxydé

— — — Coloration Ninhydrine après hydrolyse alcaline
 - - - - - Coloration Ninhydrine directe
 exprimées en conc. mM d'équivalents Leucine

suffisante. Aussi avons-nous soumis chaque peptide soit à une chromatographie sur papier dans le solvant : phénol-eau (80-20 en volume), soit dans le cas des peptides basiques à une ionophorèse sur papier à pH 3,6 ou 6,5. Parmi les 18 fractions isolées dans le

cas du lysozyme natif, 7 contiennent des acides aminés basiques. A l'étude de ces dernières, nous avons ajouté celle de P₀18. Le *tableau XV* rend compte du comportement de ces pics lors de leur chromatographie sur papier Whatman n° 1 dans le solvant A et lors de leur ionophorèse sur papier Whatman n° 1 à pH 3,6 dans le solvant D et à pH 6,5 dans le solvant C (mobilité m par rapport à l'arginine = + 1 ; R_f dans le solvant A).

TABLEAU XV

Peptide	R _f	m	
		à pH 3,6	à pH 6,5
PA 8a	0		
PA 9a	0	+ 0,19	
PA 9b	0	— 0,1	
PA10a	0	0	— 0,15
PA11	0	+ 0,07	0
PA13a	0	+ 0,23	
PA13b	0	0	
PA17 et P ₀ 17 .	0,16	+ 0,9	
P ₀ 18a	0		+ 0,2
P ₀ 18c	0,18		+ 0,5

ANALYSE DE QUELQUES PEPTIDES BASIQUES

Les peptides purifiés ont été analysés qualitativement par chromatographie sur papier, après hydrolyse acide de 16 heures, à 110°, en tube scellé dans HCl 6 N. Les acides aminés basiques ont été déterminés par chromatographie dans le phénol tamponné à pH 4 [52]; les acides aminés suivants : Asp, Glu, Gly, Ser et Thr dans le phénol tamponné à pH 4 ou à pH 10 [52]; Leu et Ileu dans le butanol tamponné à pH 4 [52]; Ala, Tyr, Val et Phe dans le solvant A. La composition quantitative est établie en comparant à l'œil sur un même chromatogramme l'hydrolysate et une gamme d'acides aminés en proportion croissante selon POLSON [57]. Cette méthode s'est révélée ici suffisante, les peptides étudiés étant relativement courts.

Dans le *tableau XVI*, nous avons noté la composition soit qualitative, soit quantitative des peptides basiques obtenus par hydrolyse pepsique du lysozyme natif et de P₀17 et P₀18.

TABLEAU XVI

PA 8a :	Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Arg
PA10a :	Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Arg
PA11b :	Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Tyr, Arg
PA13a :	Asp, Thr, Ser, Glu, Ala, Arg
PA17 :	Ala ₁ , Phe ₁ , Lys ₁
P ₀ 17 :	Ala ₁ , Phe ₁ , Lys ₁
P ₀ 18a :	Asp, Glu, Ala, Leu, Lys, His, Arg
P ₀ 18c :	Gly ₁ , Tyr ₁ , Arg ₁

STRUCTURE DE PA17 (ou P₀17)

L'acide aminé N-terminal, Ala, a été déterminé par la méthode de SANGER [61]. L'acide aminé C-terminal a été caractérisé en faisant agir la carboxypeptidase sur le peptide en présence de DFP. Phe est le seul acide aminé qui se détache après 30 minutes. La structure du tripeptide est donc : Ala . Lys . Phe.

STRUCTURE DE P₀18c

P₀18c a été traité par le dinitrofluorobenzène ; le seul DNP-acide aminé qui a pu être repéré après hydrolyse acide de 4 heures à 100° dans HCl 6 N du DNP-peptide a été la di-DNP-tyrosine. De plus, la carboxypeptidase libère dès les premières 15 minutes du glycolle (caractérisé par chromatographie sur papier) lorsqu'on la met en présence du peptide initial. La structure de P₀18c est donc : Tyr . Arg . Gly.

CHAPITRE III

Résumé des connaissances actuelles sur la structure du lysozyme

Sur les 128 résidus d'acides aminés que comporte la molécule de lysozyme, nous avons pu en répartir environ 100 dans 13 unités obtenues par hydrolyse trypsique, unités comprenant aussi bien des peptides que des acides aminés libres (*tableau XVII*). Tous les acides aminés libres ou peptides isolés après hydrolyse trypsique du lysozyme dénaturé ont été retrouvés parmi les unités tryptiques isolées après hydrolyse du lysozyme oxydé. Parmi ces dernières, trois sont constituées par des acides aminés libres : la lysine (T_08) est l'acide aminé N-terminal de la protéine ; la leucine (T_03b) est l'acide aminé C-terminal ; enfin l'arginine libre (T_014b) doit provenir d'une liaison Lys . Arg ou Arg . Arg et semble pouvoir être localisée à la suite du peptide T_03a ($T_03a + T_014b = T_010$). En effet, en établissant les structures des peptides T_03a et T_010 , nous avons montré qu'elles sont identiques, à la présence d'un résidu d'arginine C-terminale près. Or il est impossible que ce même enchaînement se retrouve deux fois dans la molécule, puisque le lysozyme entier ne contient que deux résidus de méthionine, et que le deuxième est localisé dans un autre peptide encore à l'étude. Nous n'avons naturellement compté qu'une seule fois les acides aminés de cette séquence dans le *tableau récapitulatif XVII*.

De même, le lysozyme ne contient que trois résidus de tyrosine ; or deux d'entre eux sont situés dans le peptide T_8 (ou T_016) ; il en résulte, comme cela a été expliqué précédemment, que T_05 n'est qu'une partie de T_011 . Il est également probable que la leucine libre (T_03b) fait partie du peptide T_09 .

Nous tenons compte de l'enchaînement T_4 obtenu au cours du travail préliminaire par chromatographie sur papier ; il était

TABLEAU XVII

Ac. Am.	T _p				T _o										Résidus	
	4	1	2	6	8	9	10	11	12	14a	15a	16	17	trouvés	théor.	
Asp		4	2					4		1		3	3	17	20	
Glu							1	1				1	2	5	5	
Gly						1		2	1		1	1		6	11	
Ala	1	3	2				3					1	1	11	10	
Val	1	1	1						1					4	6	
Leu		3				1	1	1			1			7	8	
Ileu		2	1					2						5	6	
Ser		3	3					2		1	1	1	1	11	9	
Thr		1	1					2		1			2	7	7	
CySO ₃ H		2	1	1		1	1							6	10	
MetO ₂							1							1	2	
Pro		1								1				2	2	
Phe									1				2	3	3	
Tyr								1				2		3	3	
His												1		1	1	
Lys		1	1	1	1		1					1		6	6	
Arg	1					1	1	1	1	1	1	1	1	9	11	
Try	1													1	8	
Total :	4	21	12	2	1	4	9	16	4	2	5	13	12	105	128	

peu probable que nous puissions le retrouver au cours de la séparation des peptides des hydrolysats T_0 et T_0A sur Dowex 50X2, car les autres peptides contenant le dérivé oxydé du tryptophane ne semblent pouvoir être décrochés de la résine qu'en milieu alcalin.

Le *tableau XVII* résume nos connaissances analytiques du lysozyme. Les quelque 30 acides aminés qui manquent semblent faire partie du ou des peptides élués en milieu alcalin (T_018 à T_020) dans lesquels la présence du dérivé oxydé du tryptophane a pu être caractérisée.

Le *tableau XVIII* résume nos connaissances sur la structure chimique du lysozyme. Nous y avons noté les enchaînements N- et C-terminaux et les structures complètes de sept unités tryptiques. Mais nous y avons également tenu compte d'une partie des résultats obtenus par hydrolyse pepsique : certains peptides formés par hydrolyse tryptique se sont donc trouvés rallongés.

L'existence du peptide PA17 (ou P_017) : Ala . Lys . Phe prouve qu'une séquence Ala . Lys doit précéder immédiatement le peptide T9 (ou T_017) ; en effet, la place de tous les résidus de phénylalanine est connue et T9 (ou T_017) est le seul peptide commençant par cet acide aminé.

Grâce à P_018c : Tyr . Arg . Gly, le peptide T8 (ou T_016) a pu être allongé d'un résidu d'acide aminé du côté C-terminal : il est en effet le seul peptide obtenu par hydrolyse tryptique ayant Tyr . Arg comme enchaînement C-terminal et l'emplacement des deux autres résidus de tyrosine est connu.

Nous pouvons noter que l'existence du peptide T8 (ou T_016) commençant par His et obtenu par hydrolyse tryptique implique la présence d'un acide aminé basique devant His. Il est donc en excellent accord avec le peptide Arg . His . Lys isolé par ACHER et coll. [38].

Plusieurs courts peptides caractérisés par LAURILA [40] ont été retrouvés dans des séquences plus longues isolées au cours de ce travail : nous avons par exemple démontré que Phe . Glu et Glu . Ser . Phe . Asp faisaient partie de la même séquence : Phe . Glu . Ser . Asp . Phe . Asp qui est un morceau de T9 (ou T_017) : Phe . Glu . Ser . Asp . Phe . Asp . Glu . Ala . Thr . Thr . Asp . Arg.

De la même façon les séquences : Asp . Ala . Tyr . Gly . Ser . Leu . Asp (NH_2) et Asp . Tyr . Arg isolés respectivement par LAURILA [40] et CROCKER [79] se sont trouvées placées l'une à la suite de l'autre dans l'enchaînement T8 (ou T_016). Nous avons pu préciser qu'en réalité le résidu asparagine ne suit pas immé-

TABLEAU XVIII
STRUCTURE PARTIELLE DU LYSOZYME

	.. Val . Ala . Try . Arg . . (T ₀ 4)	
	.. Cys . Lys . . (T ₀ 6)	
	S	
	.. Cys . Glu* . Ala . Leu . Ala . Met . Lys . Arg . .	
	S	
	(T ₀ 3a + T ₀ 14b = T ₀ 10)	
	.. Asp (NH ₂) . Arg . . (T ₀ 14a)	
	.. Thr . Pro . Gly . Ser . Arg . (T ₀ 15)	
H . Lys . Val . Phe . Gly . Arg (T ₀ 8 + T ₀ 12)	.. Arg . His . Lys . Glu* . Asp* . Ala . Tyr . Gly . Ser . Leu . Asp . Asp (NH ₂) . Tyr . Arg . Gly . . (P ₀ 18a + T ₀ 16 + P ₀ 18c)	Gly . Cys . Arg . Leu . OH S (T ₀ 9)
	.. Ala . Lys . Phe . Glu* . Ser . Asp* . Phe . Asp . Glu* . Ala . Thr . Thr . Asp* . Arg . . (PA17 + T ₀ 17)	
	.. (Cys ₂ . Asp* ₄ . Thr ₁ . Ser ₃ . Pro ₁ . Ala ₃ . Val ₁ . Leu ₃ . Ileu ₂) . Lys	
	S	
	.. (T ₀ 1)	
	.. Arg . (Gly . Tyr . Ileu . Leu .) . (Asp ₄ . Thr ₂ . Ser ₂ . Glu ₁ . Gly ₁ . Ileu ₁) . Arg . . (T ₀ 11)	

* Il n'a pas été déterminé si l'on a affaire à l'acide aspartique (ou glutamique) ou à l'asparagine (ou glutamine).

diatement la leucine, mais en est séparé par un résidu d'acide aspartique. Deux résidus de tyrosine se trouvant localisés dans ce peptide, le seul résidu tyrosine disponible et qui a été repéré dans le peptide T₀11 doit appartenir à la troisième séquence connue : Arg . Gly . Tyr . Ileu . Leu (LAURILA [40]). Sachant que la trypsine scinderait le pentapeptide ci-dessus entre Arg et Gly, nous sommes amenés à penser que le peptide T₀11 aurait la structure : Gly . Tyr . Ileu . Leu . (Asp₄, Thr₂, Ser₂, Glu₁, Gly₁, Ileu₁) . Arg.

L'enchaînement T₀10 : CySO₃H . Glu . Ala . Leu . Ala . Ala . MetO₂ . Lys . Arg est en bon accord avec l'existence du tripeptide : Ala . Ala . Met, provenant d'un hydrolysate chymotrypsique du lysozyme (LAURILA [40]), mais il ne concorde pas avec la séquence : Asp . Ala . MetO₂ . Lys . CySO₃H . Arg proposée par THOMPSON [41].

Nous sommes également en désaccord avec cet auteur d'une part au sujet du peptide Lys . Phe . Glu . Ser, différent de son enchaînement : Lys . Phe . Glu . Gly et d'autre part au sujet du pentapeptide Thr . Pro . Gly . Ser . Arg, différent de sa séquence Val . Thr . Pro . Gly . Ala. Dans ce dernier cas, la validité de l'enchaînement que nous proposons est confirmée par les observations suivantes : le lysozyme ne contient que deux résidus de proline ; l'un est engagé dans l'enchaînement Leu . Pro, isolé par LAURILA [40], l'autre fait partie du présent enchaînement : Thr . Pro . Gly. Du côté N-terminal, la spécificité des coupures obtenues par la trypsine suggère que Thr doit être précédé par un acide aminé basique. D'autre part, nous avons toujours constaté l'absence d'une alanine qui serait liée ici au carboxyle du glycocolle.

Pour expliquer partiellement ces divergences, notons que nous isolons des peptides obtenus par voie enzymatique qui de ce fait sont souvent fort longs, donc moins nombreux et plus faciles à purifier, alors que THOMPSON a obtenu après hydrolyse acide partielle un mélange très complexe de di- et de tripeptides à partir desquels cet auteur reconstitue des séquences plus longues ; ces di- et tripeptides peuvent en outre se répéter dans plusieurs séquences partiellement semblables mais non identiques de la molécule.

Il est intéressant de signaler cependant que ces deux méthodes différentes d'hydrolyse ont dans plusieurs cas donné des résultats identiques : il s'agit des séquences suivantes trouvées par THOMPSON : Phe . Asp . Glu (partie du T₉ ou T₀17) ; (Arg) . CySO₃H . Lys (T₀7) ; et (Arg) . CySO₃H . Glu . Ala (enchaînement N-terminal du peptide T₀10).

CONCLUSION

Devant le grand nombre d'agents lysants rencontrés dans la nature [26], la question s'est posée de savoir s'il s'agit d'une seule et même protéine ; ou s'il s'agit de protéines analogues, mais non pas identiques, constituant alors une véritable famille ayant en commun une structure générale, mais dont les membres se différencieraient les uns des autres par des variations plus ou moins importantes de cette structure, selon leur origine, ce qui est le cas pour les différentes insulines [10] ; ou s'il s'agit de protéines sans aucune analogie profonde entre elles, dont la communauté des trois propriétés énoncées plus haut (aptitude à provoquer la lyse de *Micrococcus lysodeikticus*, stabilité en milieu acide, labilité en milieu alcaline) ne correspondrait à aucune communauté de structure. Après avoir isolé, purifié et analysé quelques-uns de ces lysozymes [78, 80], il est possible de dire dès à présent qu'ils sont légèrement mais nettement différents les uns des autres, analogues, mais non pas identiques au lysozyme de blanc d'œuf de poule. Ces protéines constituent ainsi une famille devant permettre d'attaquer avec fruit les problèmes des rapports entre l'activité et la structure d'un enzyme. C'est en vue de ce travail que nous avons entrepris l'étude de la structure du lysozyme d'œuf. La seule comparaison des peptides obtenus par hydrolyse tryptique de deux lysozymes différents pourrait indiquer s'il existe dans les deux protéines des parties identiques peut-être nécessaires à l'activité. Les structures entières sont forcément différentes, puisque les compositions en acides aminés le sont. Si nous avons surtout insisté sur l'action de la trypsine sur le lysozyme, c'est que d'une part, de tous les enzymes protéolytiques, elle possède la spécificité la plus grande, et que d'autre part elle a permis de scinder la molécule en un nombre plus restreint de peptides. Il n'a pas encore été possible de déterminer, grâce aux peptides obtenus par hydrolyse pepsique, l'ordre de succession au sein de la molécule primitive, de tous les peptides obtenus.

nus par hydrolyse trypsique. Mais ce problème est sur le point d'être résolu, comme le montre la troisième partie de cet exposé. en appliquant les méthodes et en utilisant les résultats indiqués dans les deux premières. Ce travail a cependant permis de se faire dès à présent une idée beaucoup plus précise de la structure chimique du lysozyme de blanc d'œuf de poule.

RESUME

Le présent travail décrit d'une part les méthodes et les différentes étapes à suivre pour établir la structure chimique d'une protéine et d'autre part leur application à la détermination de la structure du lysozyme de blanc d'œuf de poule. Pour étudier la structure de cette protéine, de poids moléculaire 14 600, il était nécessaire de la fractionner en un nombre restreint de peptides de longueur moyenne, faciles à étudier. L'hydrolyse acide partielle ne se prête pas à ce genre de travail, par contre les enzymes protéolytiques conviennent à cette étude, en particulier la trypsine qui hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques impliquant les groupements carboxyliques de l'arginine et de la lysine.

L'action de la trypsine Worthington a été étudiée sur le lysozyme dénaturé par la chaleur ou oxydé par l'acide performique. La séparation des peptides est faite par chromatographie sur une colonne de résine échangeur d'ions Dowex 50X2 de 135×2 cm, selon la méthode chromatographique de HIRS, MOORE et STEIN. Les peptides sont repérés grâce à un dosage à la ninhydrine effectué après hydrolyse alcaline. L'oxydation performique qui transforme les résidus de cystine en résidus d'acide cystéique est nécessaire pour l'étude des peptides contenant cet acide aminé. Le Dowex 50 retient en effet les peptides de la cystine, alors que la chromatographie des peptides de l'acide cystéique est possible. Par hydrolyse tryptique de 6 heures à 37° (concentration en protéine : 1 % ; rapport enzyme/substrat : 1/100), 9 pics (T1 à T9) d'un rendement supérieur à 10 % ont été isolés dans le cas du lysozyme dénaturé, et 17 pics (T₀1 à T₀17) d'un rendement supérieur à 5 % dans le cas du lysozyme oxydé. Deux pics supplémentaires sont obtenus si l'on élue la résine en milieu alcalin. Les fractions correspondant à un pic donné sont dessalifiées sur une colonne de Dowex 50X2 de 20×2 cm, l'élution étant faite avec de l'ammoniaque N. La pureté du produit obtenu est vérifiée par chromatographie sur

papier et par ionophorèse sur papier à différents pH. La composition qualitative, et dans la plupart des cas aussi, la composition quantitative (par chromatographie de l'hydrolysate acide sur des colonnes de Dowex 50X4 de $135 \times 0,9$ cm) de tous ces pics a été établie. Une centaine d'acides aminés sur les 128 que comporte la protéine se sont trouvés placés. La structure complète de plusieurs de ces unités tryptiques a été établie. En général, au cours de ces déterminations, les peptides sont soumis à une hydrolyse acide partielle (24 heures ; 37° ; HCl 11,7 N) ou bien à une hydrolyse chymotryptique ou pepsique ; les produits ainsi obtenus sont purifiés par ionophorèse et analysés. Les acides aminés N-terminaux sont déterminés par les méthodes de SANGER et d'EDMAN et les acides aminés C-terminaux par action de la carboxypeptidase.

Nous avons isolé deux dipeptides, trois tétrapeptides, un pentapeptide, un octapeptide, un nonapeptide, un dodécapeptide et un tridécapeptide :

T₀₃ : CySO₃H . Glu . Ala . Leu . Ala . Ala . MetO₂ . Lys

T₀₆ : CySO₃H . Lys

T₀₉ : Gly . CySO₃H . Arg . Leu

T₀₁₀ : CySO₃H . Glu . Ala . Leu . Ala . Ala . MetO₂ . Lys . Arg

T₀₁₂ : Val . Phe . Gly . Arg

T₀₁₄ (ou T₆) : Asp (NH₂) . Arg

T₀₁₅ (ou T₇) : Thr . Pro . Gly . Ser . Arg

T₀₁₆ (ou T₈) : His . Lys . Glu . Asp . Ala . Tyr . Gly . Ser .
Leu . Asp . Asp (NH₂) . Tyr . Arg

T₀₁₇ (ou T₉) : Phe . Glu . Ser . Asp . Phe . Asp . Glu . Ala .
Thr . Thr . Asp . Arg

T₀₄ : Val . Ala . Try . Arg (venant d'un travail préliminaire)

L'enchaînement N-terminal de la protéine a été déterminé : Lys . Val . Phe . Gly . Arg et la spécificité de la trypsine vérifiée dans le cas de tous les peptides à fort rendement (sauf T₀₉) laisse supposer que la leucine libre (T₁ ou T_{03b}) est précédée d'un acide aminé basique.

La dernière étape à franchir dans l'établissement de la structure d'une protéine est de déterminer l'ordre d'enchaînement au sein de la molécule primitive des peptides formés par action de la trypsine. L'étude des peptides contenant des acides aminés basiques et obtenus par hydrolyse pepsique a permis de commencer à résoudre ce problème.

BIBLIOGRAPHIE

1. SANGER (F.) et TUPPY (H.). — *Biochem. J.*, **49** (1951) 463.
2. SANGER (F.) et TUPPY (H.). — *Biochem. J.*, **49** (1951) 481.
3. SANGER (F.) et THOMPSON (E.O.P.). — *Biochem. J.*, **53** (1953) 353.
4. SANGER (F.) et THOMPSON (E.O.P.). — *Biochem. J.*, **53** (1953) 366.
5. RYLE (A.P.), SANGER (F.), SMITH (L.F.) et KITAI (R.). — *Biochem. J.*, **60** (1955) 541.
6. BELL (P.H.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **76** (1954) 5565.
7. WHITE (W.F.) et LANDMANN (W.A.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **77** (1955) 1711.
8. SANGER (F.). — *Adv. Prot. Chem.*, **7** (1952) 1.
9. BROWN (H.), SANGER (F.) et KITAI (R.). — *Biochem. J.*, **60** (1955) 556.
10. HARRIS (J.I.), SANGER (F.) et NAUGHTON (M.A.). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **65** (1956) 427.
11. BREMER (W.W.), SINN (L.G.), STAUB (A.) et BEHRENS (O.K.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **78** (1956) 3858.
12. BERGMANN (M.) et FRUTON (J.S.). — *Adv. in Enzymol.*, **1** (1941) 63.
13. TUPPY (H.) et BODO (G.). — *Monatsh.*, **85** (1954) 1024.
14. MONIER (R.) et JUTISZ (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **14** (1954) 551.
15. DREYER (W.J.) et NEURATH (H.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **77** (1955) 814.
16. ROVERY (M.), POILROUX (M.), CURNIER (A.) et DESNUELLE (P.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **17** (1955) 565.
17. DAVIE (E.W.) et NEURATH (H.). — *J. Biol. Chem.*, **212** (1955) 515.

18. HIRS (C.H.W.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **219** (1956) 623.
19. GREEN (N.M.) et NEURATH (H.), dans NEURATH (H.) et BAILEY (K.). — *The Proteins*, New York, 2B (1954).
20. HIRS (C.H.W.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **221** (1956) 151.
21. LEGGETT BAILEY (J.), MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **221** (1956) 143.
22. REDFIELD (R.R.) et ANFINSEN (C.B.). — *J. Biol. Chem.*, **221** (1956) 385.
23. FEVOLD (H.L.). — *Adv. Prot. Chem.*, **6** (1951) 187.
24. MONIER (R.), GENDRON (Y.), JUTISZ (M.) et FROMAGEOT (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **8** (1952) 588.
25. THOMPSON (A.R.). — *Biochem. J.*, **60** (1955) 507.
26. Lysozyme, a review (Armour and Co., Chicago 9, Ill., Sept. 1952).
27. FLEMING (A.). — *Proc. Roy. Soc. (London)* B93 (1922) 306.
28. FEVOLD (H.L.) et ALDERTON (G.). — *Biochem. Prep.*, **1** (1949) 67.
29. JOLLÈS (G.) et FROMAGEOT (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **11** (1953) 95.
30. MEYER (K.), PALMER (J.W.), THOMPSON (R.) et KHORAZO (D.). — *J. Biol. Chem.*, **113** (1936) 479.
31. TALLAN (H.H.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **200** (1952) 507.
32. FROMAGEOT (C.) et GARILHE (M.P. DE). — *Biochim. Biophys. Acta*, **4** (1950) 509.
33. LEWIS (J.C.), SNELL (N.S.), HIRSCHMANN (D.J.) et FRAENKEL-CONRAT (H.). — *J. Biol. Chem.*, **186** (1950) 23.
34. FRAENKEL-CONRAT (H.), MOHAMMAD (A.), DUCAY (E.D.) et MECHAM (D.K.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **73** (1951) 625.
35. SCHROEDER (W.A.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** (1952) 5118.
36. HARRIS (J.I.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **74** (1952) 2944.
37. THOMPSON (A.R.). — *Nature*, **169** (1952) 495.
38. ACHER (R.), THAUREAUX (J.) CROCKER (C.), JUTISZ (M.) et FROMAGEOT (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **9** (1952) 339.

39. CROCKER (C.). — *Thèse Doct. Univ. Paris*, 1954 (R. Foulon, impr.).
40. LAURILA (U.R.). — *Thèse d'Ing.-Doct.*, Paris, 1955 (R. Foulon, impr.).
41. THOMPSON (A.R.). — *Biochem. J.*, **61** (1955) 253.
42. ALDERTON (G.), WARD (W.H.) et FEVOLD (H.L.). — *J. Biol. Chem.*, **157** (1945) 43.
43. HIRS (C.H.W.). — *J. Biol. Chem.*, **219** (1956) 611.
44. SLYKE (D.D. VAN) et NEILL (J.M.). — *J. Biol. Chem.*, **61** (1924) 523.
45. MUELLER (J.M.), PIERCE (J.G.) et VIGNEAUD (V. DU). — *J. Biol. Chem.*, **204** (1953) 857.
46. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **211** (1954) 907.
47. KUNKEL (H.G.) et TISELIUS (A.). — *J. Gen. Physiol.*, **35** (1951) 89.
48. THAUREAUX (J.) et ACHER (R.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **20** (1956) 559.
49. CRAIG (L.C.), HAUSMANN (W.), AHRENS (E.H. Jr.) et HARFENIST (E.J.). — *Anal. Chem.*, **23** (1951) 1236.
50. JOLLÈS (P.) et THAUREAUX (J.). — *Compt. Rend.*, **243** (1956) 1685
51. DRÈZE (A.) et BOECK (A. DE). — *Arch. Intern. Physiol.*, **60** (1952) 201.
52. McFARREN (E.F.). — *Anal. Chem.*, **23** (1951) 168.
53. ACHER (R.), FROMAGEOT (C.) et JUTISZ (M.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **5** (1950) 81.
54. TOENNIES (G.) et KOLB (J.J.). — *Anal. Chem.*, **23** (1951) 823.
55. ACHER (R.) et CROCKER (C.). — *Biochim. Biophys. Acta*, **9** (1952) 704.
56. DALGLIESH (C.E.). — *Biochem. J.*, **52** (1952) 3.
57. POLSON (A.), MOSLEY (V.M.) et WYCKOFF (R.W.G.). — *Science*, **105** (1948) 603.
58. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **192** (1951) 663.
59. MOORE (S.) et STEIN (W.H.). — *J. Biol. Chem.*, **211** (1954) 893.
60. THAUREAUX (J.) et JOLLÈS (P.). — *Compt. Rend.*, **243** (1956) 1926.
61. SANGER (F.). — *Biochem. J.*, **39** (1945) 511.

62. BIZERTE (G.) et OSTEUX (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33** (1951) 50.
 63. CIFONELLI (J.A.) et SMITH (F.). — *Anal. Chem.*, **26** (1954) 1132.
 64. EDMAN (P.). — *Acta Chem. Scand.*, **4** (1950) 283.
 65. EDMAN (P.). — *Acta Chem. Scand.*, **4** (1950) 700.
 66. ROVERY (M.) et FABRE (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35** (1953) 541.
 67. ANFINSEN (C.B.), REDFIELD (R.R.), CHOATE (W.L.), PAGE (J.) et CARROLL (W.R.). — *J. Biol. Chem.*, **207** (1954) 201.
 68. GREEN (F.C.) et SCHROEDER (W.A.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **73** (1951) 1385.
 69. THOMPSON (A.R.). — *Nature*, **168** (1951) 390.
 70. BELL (P.H.), BONE (J.F.), ENGLISH (J.P.), FELLOWS (E.C.), HOWARD (K.S.), ROGERS (M.M.), STEPHARD (R.G.) et WINTER-BOTTOM (R.). — *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, **51** (1949) 897.
 71. PERRONE (J.C.). — *Nature*, **167** (1951) 513.
 72. SANGER (F.). — *Biochem. J.*, **45** (1949) 565.
 73. LANDMANN (W.A.), DRAKE (M.P.) et DILLAHA (J.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, **75** (1953) 3638.
 74. OHNO (K.). — *J. Biochem. (Japan)*, **42** (1955) 615.
 75. BRADBURY (J.H.). — *Nature*, **178** (1956) 912.
 76. OHNO (K.). — *J. Biochem. (Japan)*, **40** (1953) 621.
 77. OHNO (K.). — *J. Biochem. (Japan)*, **41** (1954) 345.
 78. GREEN (N.M.) et NEURATH (H.), dans NEURATH (H.) et BAILEY (K.), *The Proteins*, New York, **2B** (1954).
 79. JOLLÈS (G.) et FROMAGEOT (C.). — *Biachim. Biophys. Acta*, **14** (1954) 219.
 80. JOLLÈS (P.). — *Congr. intern. biochim. Résumés communs*, 3^e Congr. Bruxelles, 1955, 8.
-

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	7
----------------------	---

Première partie

ACTION DE LA TRYPSINE SUR LE LYSOZYME

CHAPITRE I. — Le lysozyme de blanc d'œuf de poule	13
CHAPITRE II. — Action de la trypsine sur le lysozyme dénaturé et oxydé	16
CHAPITRE III. — Séparation des peptides de l'hydrolysat trypsique ..	20
CHAPITRE IV. — Purification des peptides de l'hydrolysat trypsique.	32
CHAPITRE V. — Analyse qualitative et quantitative des peptides de l'hydrolysat trypsique	37

Deuxième partie

ETUDE DE LA STRUCTURE DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE

CHAPITRE I. — Structure des 4 peptides de l'hydrolysat trypsique du lysozyme dénaturé	49
CHAPITRE II. — Structure de quelques peptides de l'hydrolysat trypsique du lysozyme oxydé	56
CHAPITRE III. — Spécificité de la trypsine : application au lysozyme d'œuf de poule	62

Troisième partie

STRUCTURE PARTIELLE DU LYSOZYME

CHAPITRE I. — Enchaînements N- et C-terminaux du lysozyme ..	67
CHAPITRE II. — Hydrolyse pepsique du lysozyme d'œuf de poule ..	71
CHAPITRE III. — Résumé des connaissances actuelles sur la structure du lysozyme	77
Conclusion	83
Résumé	85
Bibliographie	87

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

**SYNTHESE DES PEPTIDES
DE L'ARGININE ET DE LA LYSINE**

Vu et approuvé :

Paris, le 1^{er} juin 1957

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

Vu et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

